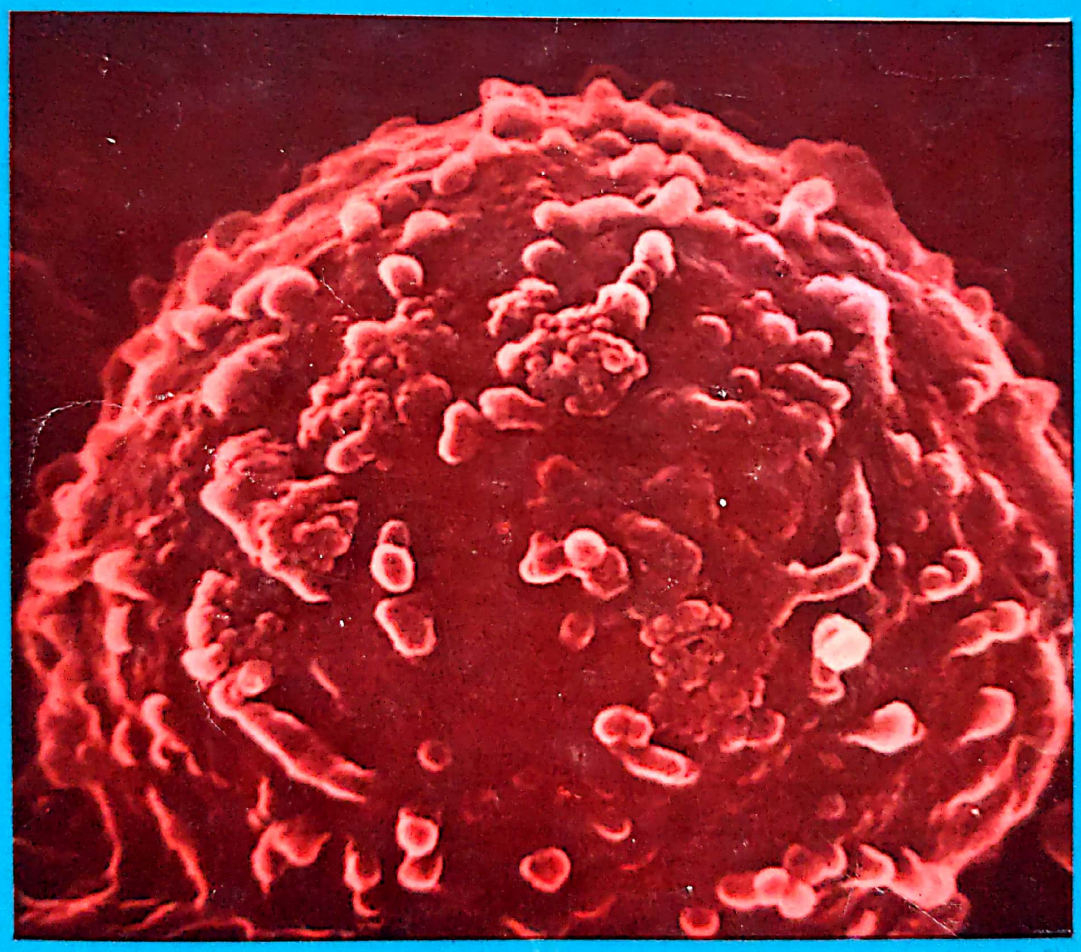
N. MANOLESCU, V. CIOCNITU, C. DIMITRIU

ULTRASTRUCTURA unor celule sanguine în microscopia electronică de baleiaj



EDITURA ȘTIINȚIFICĂ ȘI ENCICLOPEDICĂ

Scanned with OKEN Scanner

Referenți științifici :

— Prof. dr. doc. ȘT. BERCEANU
șeful clinicii de hematologie,
spit. clinic Fundeni, București

— Prof. dr. doc. N. CAJAL, director al
Institutului de virusologie
„*Șt. Nicolau*“, București

— dr. doc. V. GHEȚIE, șeful laboratorului
de imunologie, Inst. *V. Babeș*

Scanned with OKEN Scanner

N. MANOLESCU
V. CIOCNITU
C. DIMITRIU

ULTRASTRUCTURA UNOR CELULE SANGUINE ÎN MICROSCOPIA ELECTRONICĂ DE BALEIAJ

EDITURA ŞTIINŢIFICĂ ŞI ENCICLOPEDICĂ
București 1979

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Prefață 9
Cuvînt înainte 11

CAPITOLUL I

TEHNICA MICROSCOPIEI ELECTRONICE ÎN BALEIAJ (SEM)
(C. Dimitriu) 13

1. Principiile folosirii microscopului electronic în baleiaj (SEM) 13

1.1. Tipurile de semnale 14
1.2. Reconstituirea imaginii preparatului (sp.) 15
1.3. Contrastul 16
1.4. Rezoluția 22
1.5. Zgomotul 23

2. Aparatura în baleiaj 24

2.1. Microscopul SEM 24
2.2. Aparatura de metalizare 28

3. Condițiile necesare obținerii unei imagini SEM de calitate 30

3.1. Focalizarea 31
3.2. Astigmatismul 31
3.3. Curățenia coloanei și a aperturilor 31
3.4. Azotul lichid 33
3.5. Diametrul aperturii 33
3.6. Tensiunea de accelerare 33
3.7. Metalizarea 37
3.8. Fotografierea 37

CAPITOLUL II

METODE DE OBȚINERE A PREPARATELOR DIN ORGANE HEMATOPOETICE SPECIFICE PENTRU EVIDENȚIEREA ÎN BALEIAJ (SEM) (V. Ciocnitu) 39

4. Principii generale privind tehnica de obținere a preparatelor pentru examinarea în baleiaj (SEM) 39

4.1. Modul de recoltare a preparatelor biologice 40
4.1.1. Preparate din sînge global 40
4.1.2. Preparate din concentrat leucocitar 41
4.1.3. Preparate din măduva hematopoetică 41
4.1.4. Preparate din limfoganglioni 42
4.1.5. Preparate din splină 42
4.1.6. Preparate din bursa lui Fabricius 42
4.1.7. Preparate din lichidul peritoneal 43
4.2. Tehnica de pregătire a celulelor recoltate 43
4.2.1. Fixarea 44
4.2.2. Postfixarea 46
4.2.2.1. Postfixarea în tetraoxid de osmiu 46
4.2.2.2. Postfixarea în permanganat de potasiu 47
4.2.2.3. Postfixarea în crom-osmiu 47
4.2.3. Deshidratarea 47
4.2.4. Montarea pe suportul microscopului (holder) 48
4.2.5. Uscarea 48
4.2.6. Metalizarea 49
4.3. Examinări speciale 49

5. Tehnici de preparare recomandate 52

CAPITOLUL III

TIPIZAREA CELULELOR HEMATOPOETICE NORMALE ÎN BALEIAJ (SEM) (N. Manolescu — V. Ciocnitu) 59

6. Descrierea comparată a liniilor celulare normale diferențiabile în baleiaj 59

6.1. Linia limfoidă 60
6.1.1. Celulele limfocitare „T“ 60
6.1.1.1. Limfoblaștii „T“ 60
6.1.1.2. Prolimfocite „T“ 61
6.1.1.3. Limfocite adulte „T“ 62
6.1.2. Celule limfocitare „B“ 62
6.1.2.1. Limfoblaștii „B“ 63
6.1.2.2. Prolimfocite „B“ 64
6.1.2.3. Limfocite adulte „B“ 68
6.2. Linia histio-monocitară 77
6.2.1. Monoblaștii și histioblastele 77
6.2.2. Histiocitele 78
6.2.3. Monocitele 79
6.2.4. Histiocitele macrofagice 79

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL IV

ASPECTE DE PATOLOGIE SANGVINĂ ÎN BALEIAJ (SEM)
(N. Manolescu) 81

7. Limfoame maligne, în general 81

7.1. Aspecte de transformare sarcomatoidă a elementelor limfo-monocito-proliferative 83
7.1.1. Forma și mărimea celulei sarcomatoase 83
7.1.2. Morfoarhitectura de suprafață 83
7.2. Leucemia limfoidă cronică (LLC) 98
7.3. Leucemia limfoidă acută (LLA) 104
7.4. Leucemia paralimfoblastică (LPL) 116
7.5. Leucemia monocitară (LM) 124
7.6. Leucemia histio-monocitară (LHM) 126

Bibliografie 136
Summary 141
Резюме 143

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Una dintre cele mai noi modalități de investigație a ultrastructurii celulare este și microscopia electronică în baleiaj (SEM). Ea a contribuit, în ultimii ani, la progresul științelor medicale, în general și la adîncirea cunoștințelor privind structura spațială/tridimensională a elementelor figurate ale sîngelui, în special.

Această cale nouă, abordată în străinătate în ultimii 3—4 ani, a permis ca și în țara noastră, grație dotărilor deosebite, să poată fi abordate și cercetări care, pentru cei ce sînt mai puțin familiarizați cu aceste tehnici să pară o exclusivitate fundamentală. *— Lucrarea prezentă, prin noutatea subiectului, se dovedește a fi un ghid în activitatea practică și curentă.*

Cartea colaboratorilor mei N. Manolescu, V. Ciocnitu și C. Dimitriu este rodul unei experiențe personale de circa 3 ani în microscopia electronică în baleiaj (SEM). Ea a fost precedată de o serie de comunicări și publicații cu subiecte de hematologie comparată.

Primul capitol se referă la ansamblul de principii ce stau la baza utilizării microscopului electronic în baleiaj.

Capitolul II prezintă unele metode de obținere tehnică a preparatelor din organele hematoformatorii și sînge în care se îmbină experiența personală a autorilor cu datele existente din literatură.

În celelalte două capitole se fac referiri cu privire la modul de tipizare al elementelor celulare mononucleare normale la om și la principalele animale domestice evidențiind particularitățile legate de specie cît și aspectele oferite de proliferarea malignă ale acelorași linii celulare mononucleare.

Partea finală a lucrării, cea mai importantă ca pondere, scoate în evidență tabloul morfologic al formelor de leucemii evidențiindu-se totodată, similitudinile cît și diferențierile posibile între leucemiile umane și cele ale animalelor domestice.

Toate datele din acest valoros material se bazează pe o cazuistică numeroasă și pe o iconografie ireproșabilă atît din punct de vedere științific, cît și ca execuție tehnică.

Cea mai importantă concluzie care se desprinde după parcurgerea lucrării este aceea că astăzi investigaţiile bolilor de sînge de tip malign la om şi animale nu se mai pot face cu mijloace de microscopie optică obişnuită fără o coroborare a acestora cu rezultatele furnizate de microscopia electronică în baleiaj (SEM).

Menţionez că această carte este prima de acest gen din literatura care analizează comparativ datele cunoscute anterior la om cu cele recente obţinute la animale.

Recomand cu căldură această carte atît medicilor umani citohematologi, medicilor veterinari, inginerilor zootehnişti, biologilor cît şi celor ce doresc să cunoască noi imagini privind structura tridimensională a lumii celulare.

Prof. Dr. doc. IOAN MORARU

Vicepreşedinte al Academiei
de Ştiinţe Medicale
Directorul Institutului
„Victor Babeş"
Preşedinte al Comisiei
de Microscopie Electronică

Bucureşti,
septembrie 1978

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

CUVÎNT ÎNAINTE

Cartea este rezultatul experienței colectivului de microscopie electronică din Institutul de cercetări veterinare și biopreparate „Pasteur", Institutul de Biologie și se adresează medicilor umani și veterinari, biologilor, anatomopatologilor, histologilor, geneticienilor, cercetătorilor și, bineînțeles, studenților medicinești, biologi, zootehniști.

Cele patru părți ale lucrării întregesc un tot organic care face să poată fi folosită, atît ca îndreptar de morfostructură de exterior celular, cît și ca un veritabil vademecum *tehnic de cunoaștere și corijare a eventualelor erori ce pot apărea în timpul manipulării microscopului electronic în baleiaj.*

Acestea îl fac accesibil oricărui medic sau biolog care dorește să se inițieze în domeniul microscopiei tridimensionale (baleiaj).

Tehnicile specifice examinării preparatelor biologice în baleiaj sînt însoțite de note critice și de unele rețete verificate în cadrul colectivului nostru.

Materialul iconografic a fost realizat integral cu ajutorul unui microscop produs de firma JEOL, tip JEM 100 C cu anexa ASID4 și SEG.

Caracteristicile tridimensionale ale celulelor sanguine normale sînt descrise astfel încît, cu aceste cunoștințe, să se poată opera mai competent în vastul și complicatul cîmp de cunoaștere a hemopatiilor maligne la om și animale. Astăzi progresul în domeniul științelor medicale nu mai este posibil fără adoptarea unor tehnici de excepție chiar și la investigațiile curente.

Această carte a putut fi realizată grație dotării excepționale a I.C.V.B. „Pasteur", cu care ocazie aducem cele mai calde mulțumiri conducerii de partid și de stat cărora dedicăm această carte ca un modest mod de a mulțumi.

Aducem mulțumiri conducerii I.C.V.B. „Pasteur" pentru înțelegerea și sprijinul permanent acordat.

De asemenea, ținem să subliniem că merite deosebite, la elaborarea finală a acestei lucrări, revin tovarășului dr. doc. Dumitru Micu, șeful laboratorului de hematologie de la Institutul de Medicină Internă „N. Gh. Lupu" care ne-a pus la dispoziție o vastă cazuistică umană.

Mulțumim îndeosebi tovarășului prof. dr. doc. Ioan Moraru — directorul Institutului „V. Babeș", vicepreședinte al Academiei de Științe Medicale care ne-a onorat cu îndemnul de a publica această carte ; mulțumim prof. dr. doc. Ștefan Berceanu, șeful clinicii de hematologie „Fundeni", și prof. dr. doc. Nicolae Cajal, membru corespondent al Academiei R.S.R. — directorul Institutului de Virusologie „Șt. S. Nicolau" — care ne-au ajutat și îndrumat.

Ne face o deosebită plăcere să mulțumim pe această cale Editurii științifice și enciclopedice pentru condițiile de excepție în care s-a executat tipărirea cărții.

Eventualele observații critice din partea cititorilor le așteptăm cu gratitudine colegială.

AUTORII

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL I

TEHNICA MICROSCOPIEI ELECTRONICE ÎN BALEIAJ (SEM)

1. PRINCIPIILE FOLOSIRII MICROSCOPULUI ELECTRONIC ÎN BALEIAJ (SEM)

Microscoapele electronice în baleiaj (SEM) *, care lucrează cu electroni secundari, au puterea de rezoluție în jur de 50 Å și au domeniul de mărire cuprins între limitele 15 * și 100 000×. Microscopul în baleiaj, ca și microscopul optic în lumină reflectată, redă imaginea suprafeței preparatului (specimen). Să observăm că domeniul de mărire al microscopului în baleiaj acoperă și pe cel al microscopului optic ; același preparat (specimen) vizionat la cel optic, în lumină reflectată, va arăta altfel decît la SEM, aceasta pentru că lentilele magnetice permit o adîncime de focalizare mult mai mare pentru electroni decît permit lentilele optice. Spre exemplu, la mărirea de 400 X, toate punctele ce formează profilul unui preparat (specimen) pe o adîncime de 100 microni vor apare în clar în imaginea SEM în timp ce la optic doar zonele cuprinse într-o adîncime de pînă la 1 micron, vor fi clare. Evident, doar în primul caz se poate spune că în spațiul bidimensional al fotografiei s-a redat relieful preparatului (sp.). Pentru exemplificare, în fig. I-1 am desenat un preparat cu denivelări de maximum 100 microni. Posibilitatea redării în clar într-o fotografie a planurilor de la diferite adîncimi ale preparatului (sp.), face posibilă vizionarea stereoscopică a lui. După ce s-a fotografiat, preparatul (sp.) este înclinat cu 5°—10° și se fotografiază din nou. Vizionate stereoscopic, cele două fotografii vor da o imagine spațială a preparatului, iar cu un dispozitiv special i se pot măsura adîncimile, fapt care furnizează informații suplimentare (fig. I-2 a și b).

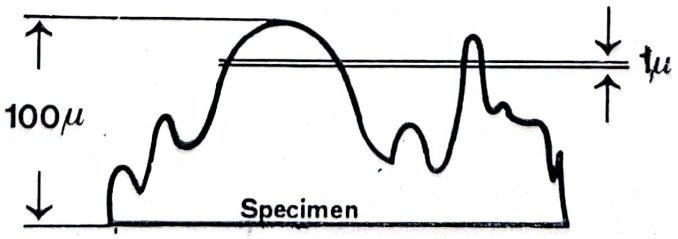


Fig. I-1

* SEM = Scanning Electron Microscope.

Scanned with OKEN Scanner

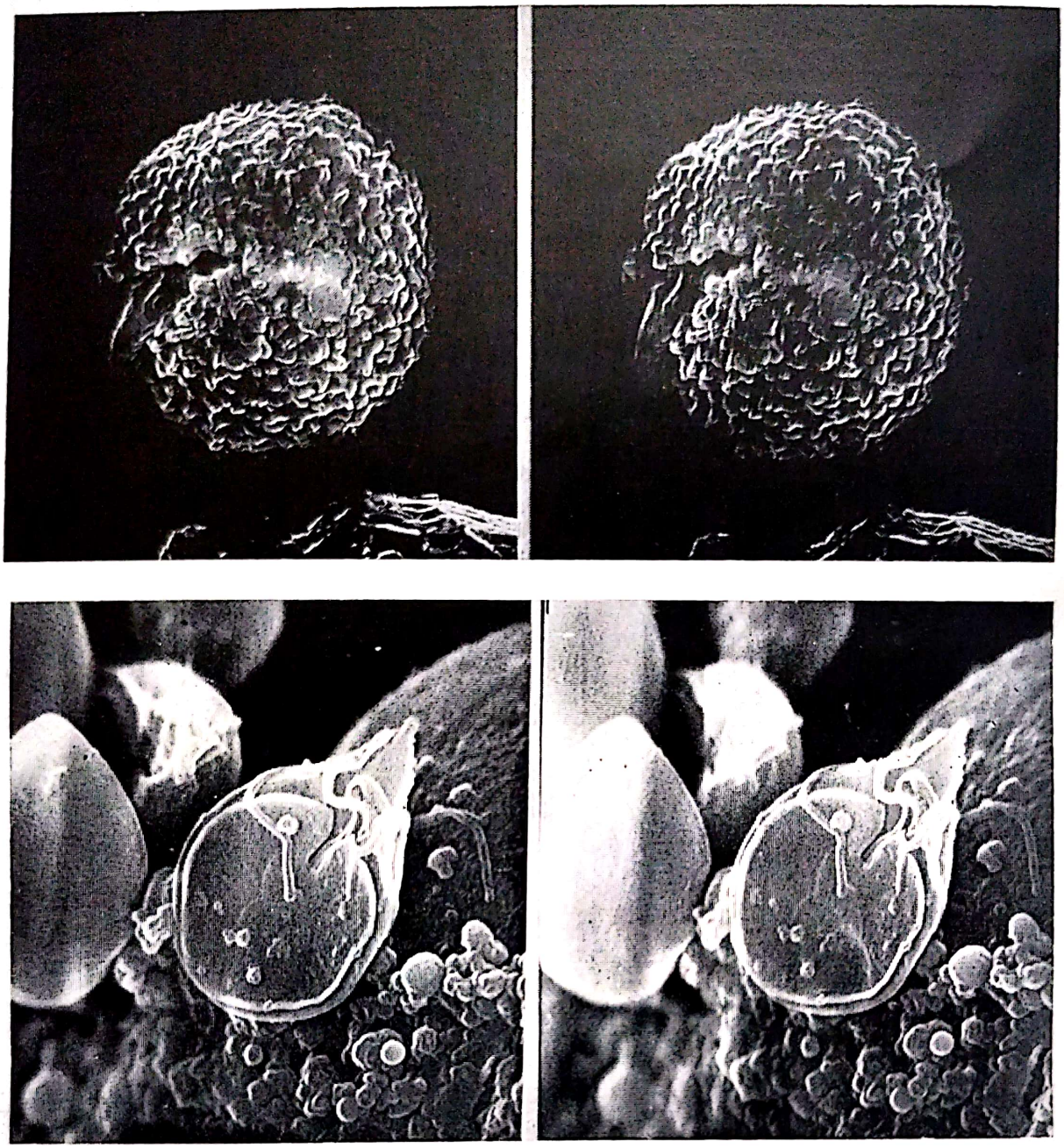


Fig. I-2 a) Două imagini stereoscopice fotografiate la SEM, înclinate la 10° una față de cealaltă. Mărirea 2 000 x ;
b) Două imagini stereoscopice fotografiate la SEM, înclinate la 5° una față de cealaltă. Mărire 7 000 x.

1.1. Tipurile de semnale

Electronii unui fascicul proiectat pe preparat (sp.) pot trece, pot fi absorbiți sau pot fi reflectați de preparat (sp.). De asemenea electronii din fasciculul proiectat pot excita atomii preparatului, care vor emite raze X sau electroni Auger sau pot scoate electroni din atomii preparatului (specimenului) care ies în toate direcțiile din preparat și constituie „electroni secundari", avînd energia cuprinsă între unul și cîteva zeci de electroni-volți. Din cauza energiei lor mici, numai electro-

Scanned with OKEN Scanner

nii secundari generați în apropierea suprafeței preparatului (sp.) vor putea părăsi preparatul (sp.).

În fig. I-3 sînt reprezentate cîteva din radiațiile rezultate în urma interacțiunii dintre un fascicul incident de electroni și preparat (sp.). Înregistrată și analizată, fiecare dintre aceste radiații dă informații specifice asupra preparatului (sp.). În sistemul microscopului electronic de baleiaj, de pe preparat (sp.) putem culege imagini în raze X, imagini în

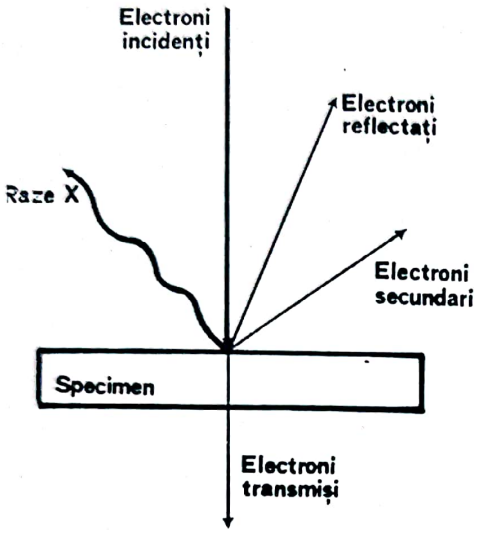


Fig. I-3

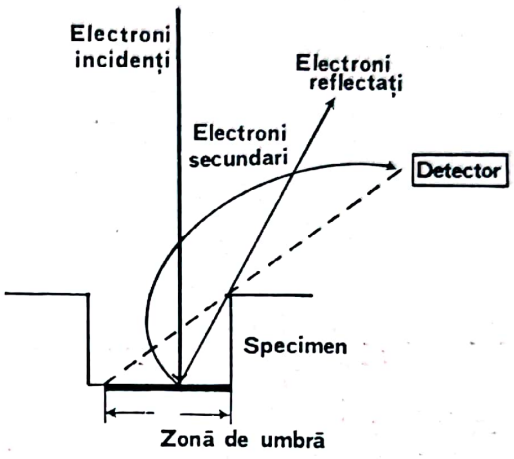


Fig. I-4

electroni reflectați, imagini în electroni secundari sau, dacă utilizăm electronii care trec prin preparat (sp.), imagini în electroni transmiși (STEM) *. Imaginea STEM este asemănătoare cu imaginea din microscopul electronic clasic de transmisie cu deosebire că imaginea STEM este mult mai contrastă, are o rezoluție mai slabă și este vizibilă și pentru preparate (secțiuni) mai groase. Deși este asemănătoare cu imaginea în electroni reflectați, imaginea SEM este mai puțin contrastă și evidențiază și detaliile din umbră ale preparatului (sp.). Aceasta din cauză că electronii reflectați, avînd energii mari (cîteva zeci de mii de eV), nu pot fi colectați din acele zone ale preparatului (sp.) care nu sînt „văzute" din unghiul detectorului (fig. I-4), în timp ce electronii secundari, avînd energie joasă, pot fi cu ușurință colectați de un detector aflat la un potențial pozitiv rezonabil. De aceea, pentru studiul preparatelor plate sau cu denivelări mici, se recomandă imaginea cu electroni reflectați, iar pentru preparatele (sp.) cu meandre, cum ar fi cele de origine biologică, se recomandă imaginea cu electroni secundari. *Toate imaginile* din această carte sînt de tipul cu *electroni secundari*.

1.2. Reconstituirea imaginii preparatului (sp.)

Se realizează prin procedeul TV (fig. I-5). Fasciculul de electroni incident E, este baleat pe suprafața specimenului, astfel că fiecare punct al său va emite succesiv un anumit număr de electroni secundari care,

* STEM = scanning transsmision electron microscope.

în urma detecției lor de către detector, dau semnale electrice ce sînt amplificate de către amplificatorul video și aplicate cilindrului Wehnelt al tubului catodic (TC). Acest fapt provoacă, în punctele de contact dintre raza electronică E′ a TC și ecranul său fluorescent, o variație a strălucirii luminoase în ritmul emisiei secundare. Dacă raza E′ care parcurge

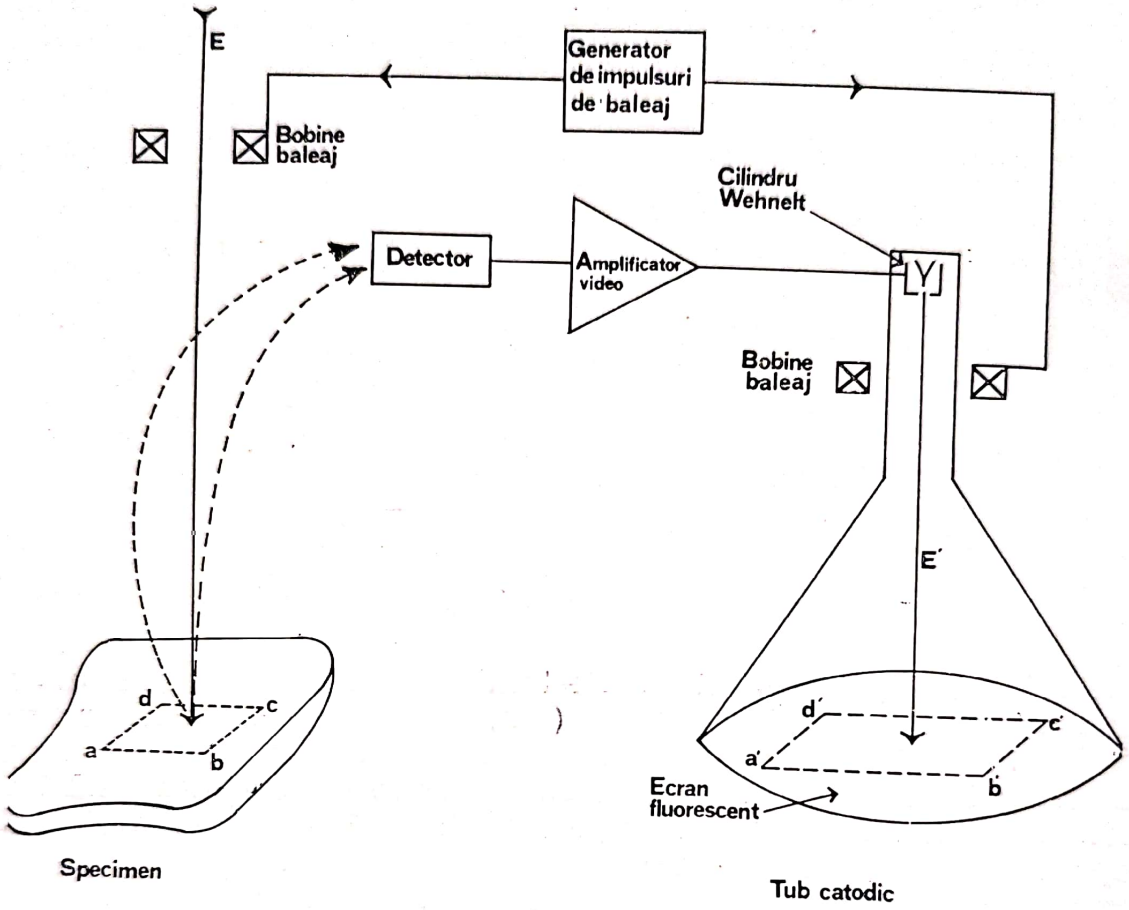


Fig. I-5

suprafața a′, b′, c′, d′, este baleată sincron cu raza E care parcurge suprafața a, b, c, d, atunci pe ecran se va obține imaginea în electroni secundari a preparatului (sp.), la o mărire de $\frac{a'\ b'}{a\ b}$ ori.

1.3. Contrastul

Intensitatea emisiei secundare depinde, în principal, de unghiul sub care cade fasciculul incident de electroni pe suprafața preparatului (sp.). Cum acest unghi variază în funcție de relief, pe ecran se va reconstitui imaginea reliefului preparatului (sp.). S-a constatat că, pe măsură ce unghiul scade (fig. I-6), emisia secundară crește, astfel că, spre exemplu, imaginea unei sfere va arăta ca un disc strălucitor pe margine. Cauza acestui fenomen trebuie căutată în faptul anterior menționat

(v. 1.1) : electronii secundari emiși la o adîncime prea mare nu mai pot ieși din preparat (sp.). În fig. I-7 se vede că volumul din specimen, care participă la emisia secundară, este mai mare pentru $\alpha = 0°$ decît pentru

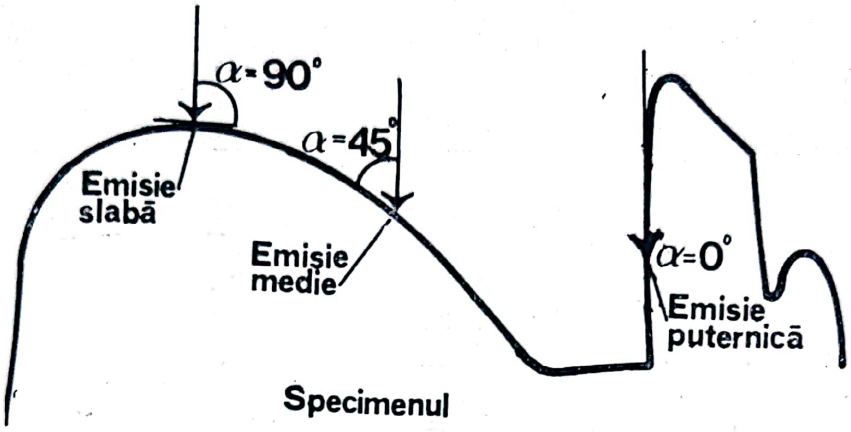


Fig. I-6

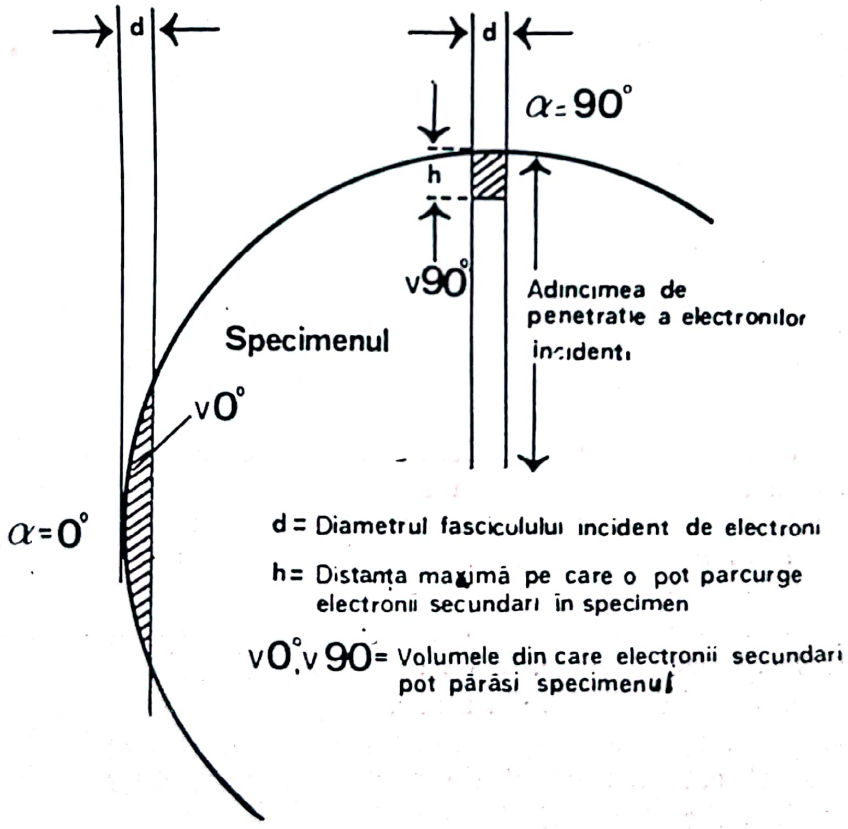


Fig. I-7

$\alpha = 90°$. În fotografia de la fig. I-8 se ilustrează dependența strălucirii de unghiul α. Efectul descris, care mai poartă denumirea de „efect de margine", scade pe măsura micșorării tensiunii de accelerare a electronilor din fasciculul incident, deoarece este evident că volumul V 90° (fig. I-7) este mult mai puțin afectat de micșorarea adîncimii de penetrație

Scanned with OKEN Scanner

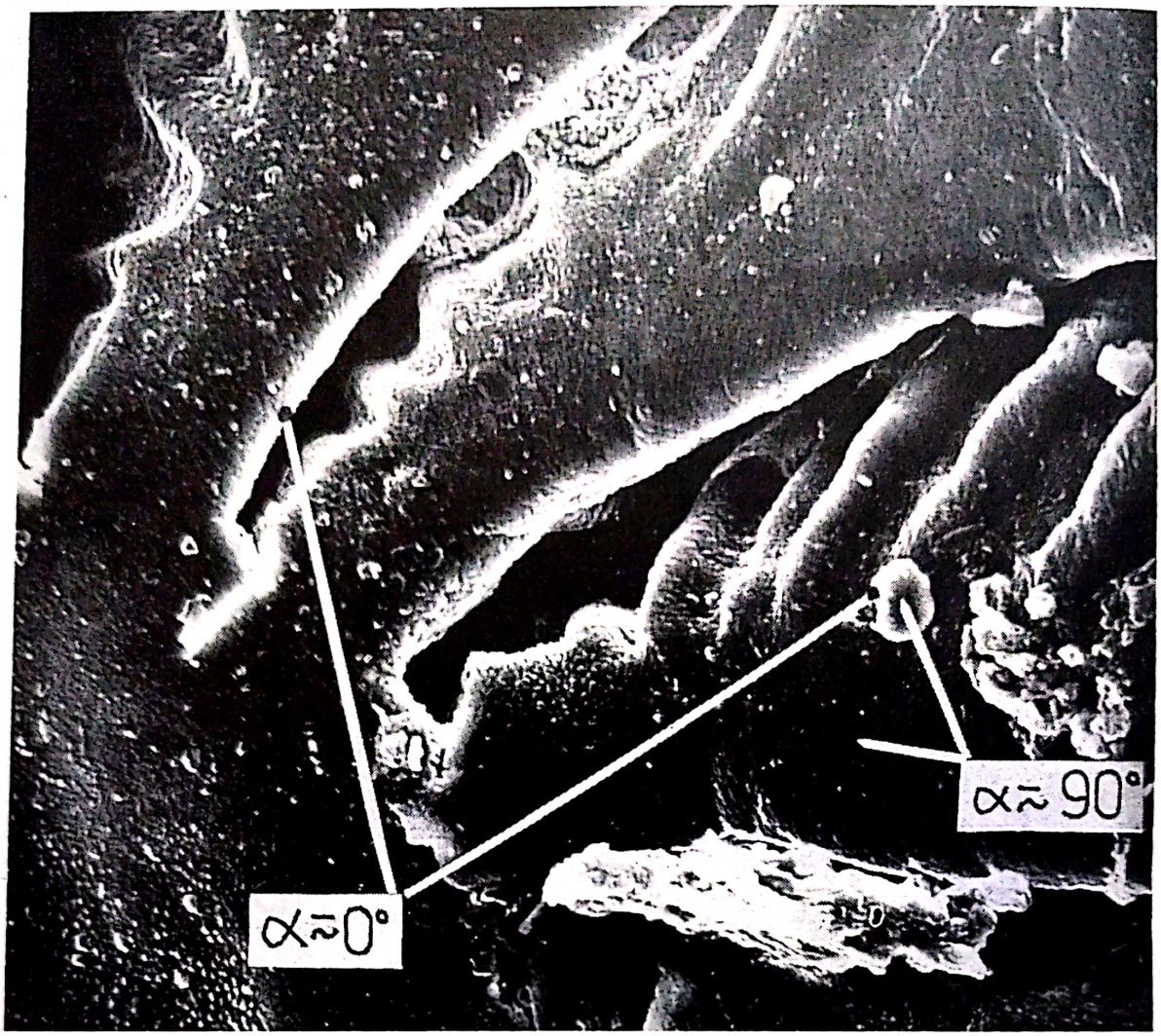


Fig. I-8 : Imagine SEM care ilustrează dependența strălucirii de unghiul sub care cad electronii pe suprafața preparatului. Mărire 150 x.

în preparat (sp.) a electronilor incidenți decît este volumul V 0°. În fig. I-9 (a și b) se ilustrează creșterea efectului de margine cu tensiunea de accelerare a electronilor incidenți. Un alt efect al adîncimii de penetrație în preparat (sp.) a electronilor incidenți este cel al micșorării contrastului detaliilor la tensiuni mari de accelerație. La 40 KV, penetrația fiind mare (fig. I-10), volumul V_{40} din care se emit electroni este mai mare decît V_{10}. Prin baleiere, V_{40} va fi mai puțin afectat de profilul preparatului (sp.) decît este V_{10}. Ca atare, contrastul detaliilor se va micșora la tensiuni mari, ajungîndu-se în cazul detaliilor mici pînă la anularea lui. Acest efect este accentuat de participarea electronilor reflectați la *semnalul video*. Aceștia, avînd energii considerabile, pot trece de preparat (sp.) și ajung la detector, chiar atunci cînd sînt emiși la adîncimi mari de penetrație în preparat (sp.). Figura I-11 ilustrează efectul pierderii detaliilor prin mărirea tensiunii de accelerare. În afară de condițiile de interacțiune dintre electronii incidenți și preparat, contrastul imaginii SEM este dat și controlat în limite largi de parametrii schemei electronice (v. 2.1).

Scanned with OKEN Scanner

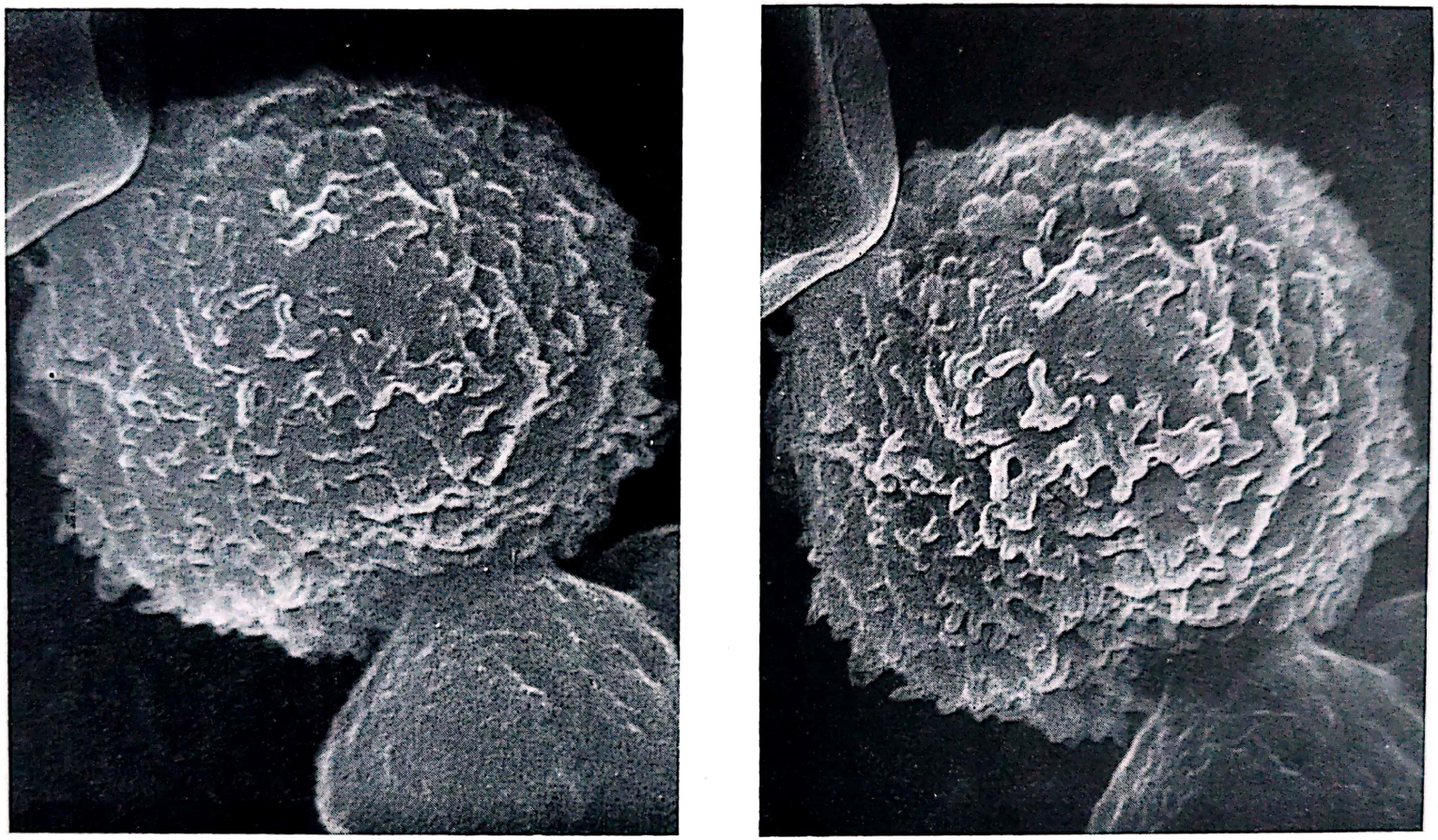


Fig. I-9 : Două imagini SEM ale aceluiași element de preparat. a) imaginea SEM la 20 KV tensiune de accelerare ; b) imaginea SEM la 10 KV tensiune de accelerare. Mărire 16 000 x.

Scanned with OKEN Scanner

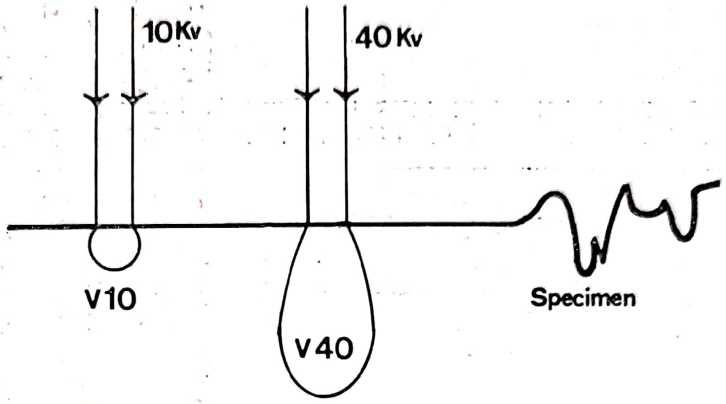


Fig. I-10

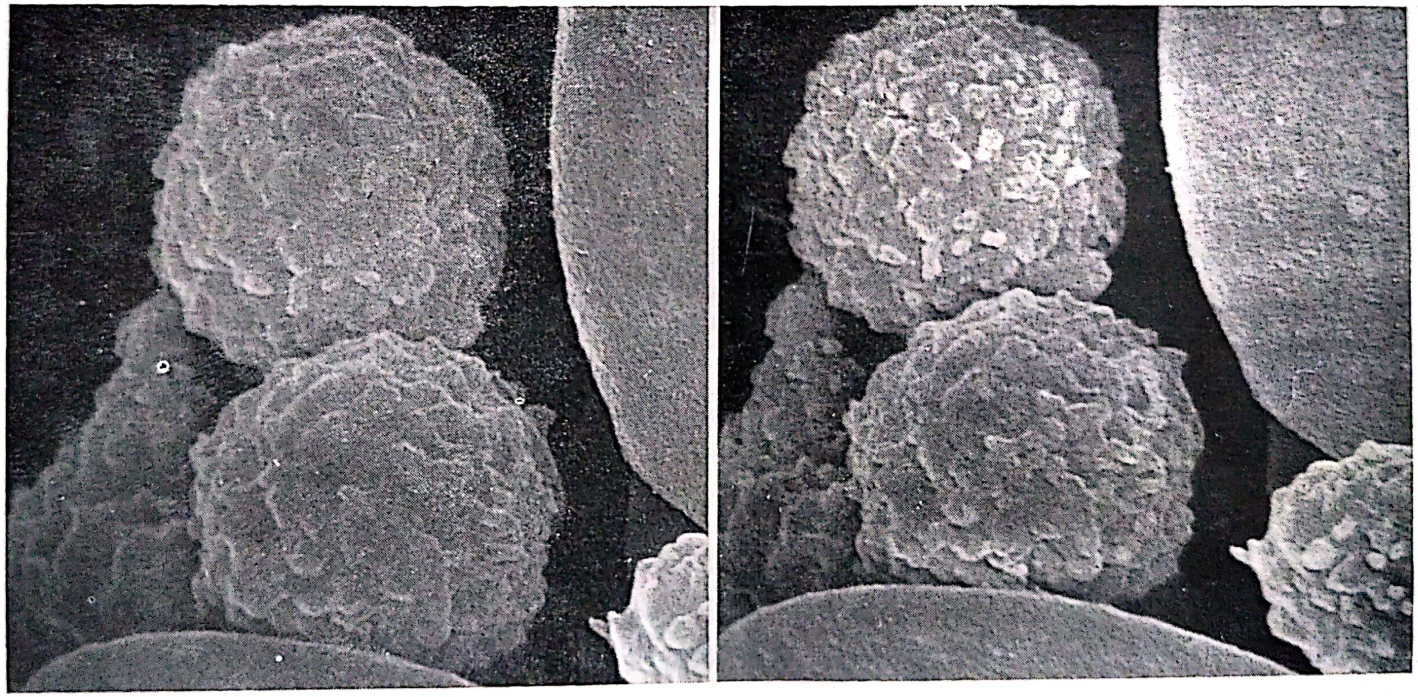
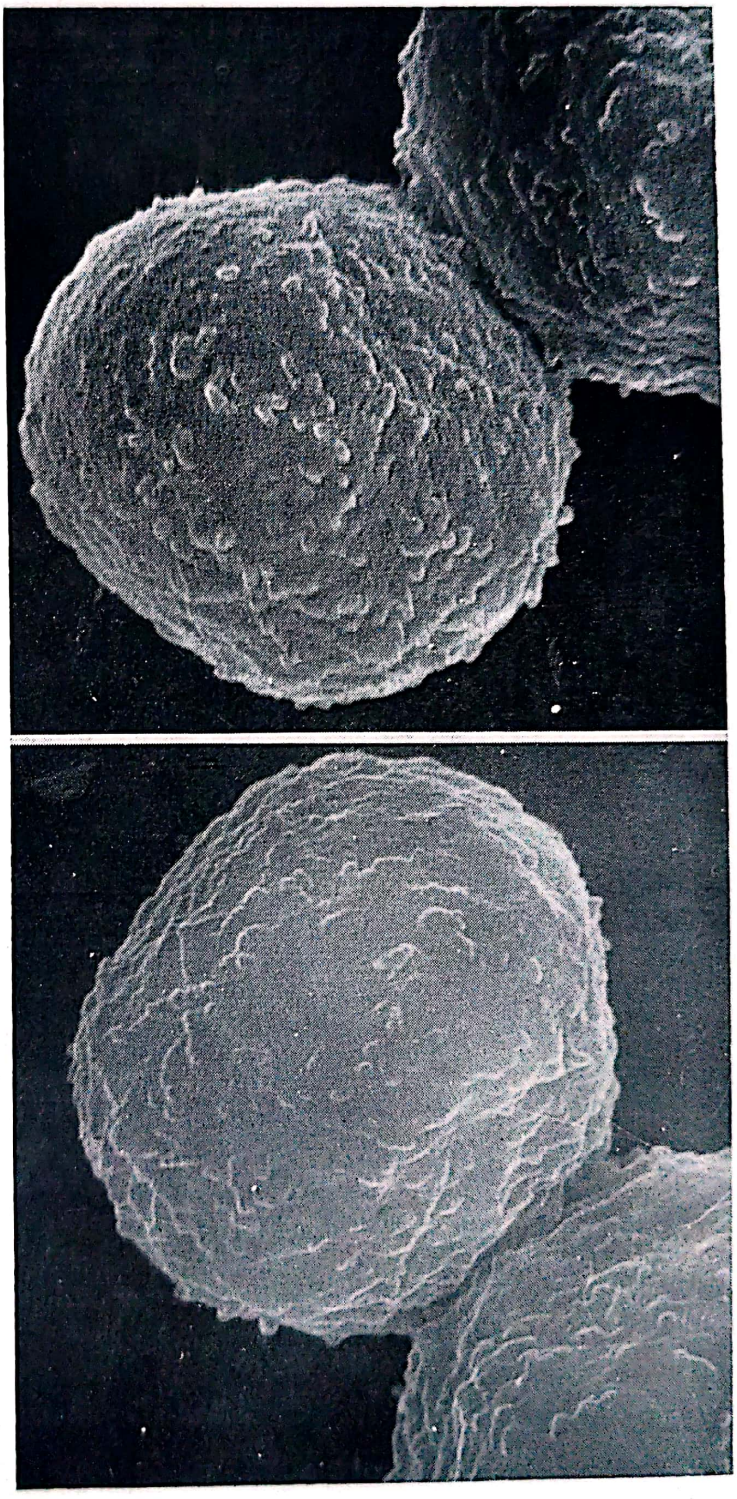


Fig. I-11 : Două perechi de imagini SEM care ilustrează efectul pierderii detaliilor prin mărirea tensiunii de accelerare. Același element de specimen s-a fotografiat de două ori : la 20 KV și 10 KV. Se poate observa cu ușurință că imaginile de 10 KV conțin mai multe detalii și mai bine reliefate.



Scanned with OKEN Scanner

1.4. Rezoluția

Din Fig. I-12 se vede că dacă diametrul (d) al fasciculului incident de electroni baleiați pe preparat (sp.) nu este suficient de mic, cele 2 elemente de relief vor apare pe ecran ca unul singur. Pentru a fi distincte, este necesar ca (d) să fie în orice caz mai mic decît distanța (d'), dintre cele două elemente. De fapt (d) trebuie să fie substanțial mai mic

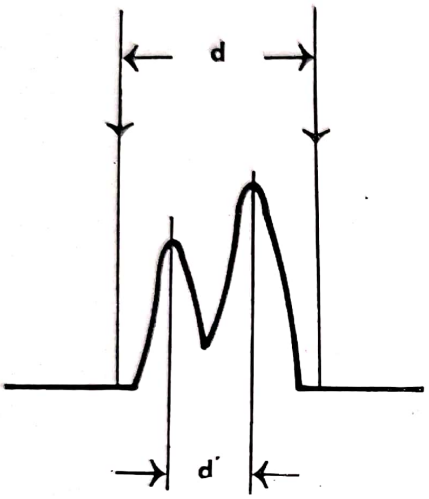


Fig. I-12

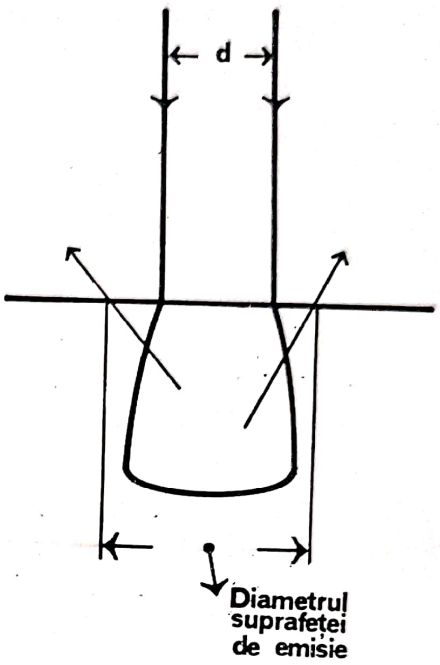


Fig. I-13

ca (d'), deoarece electronii secundari, fiind emiși în toate direcțiile, vor ieși din preparat (sp.) printr-o suprafață mai mare decît cea a spotului incident, fapt care micșorează rezoluția (fig. I-13). Rezoluția depinde deci de posibilitatea realizării unui spot incident de electroni cît mai fin cu putință. Diametrul (d) intră în relația : $d_0^2 = \frac{4\,i}{0{,}6\,\pi\,J\,\alpha}\,2 \cdot \frac{kT}{eV}$ unde d_0 este diametrul minim al fasciculului incident de electroni, $J\alpha$ este densitatea curentului de emisie la catod, e este sarcina electronului, V este tensiunea de accelerare a electronilor, i este intensitatea fasciculului de electroni, α este semiunghiul de convergență a fasciculului de electroni, k este constanta lui Boltzmann, iar T este temperatura absolută a catodului. Deoarece spotul este realizat cu lentile electromagnetice, defectele lor (aberațiile de sfericitate, aberațiile cromatice, astigmatismul, efectul de difracție) vor mări valoarea lui d_0 ; spre exemplu, luînd în considerație numai aberațiile de sfericitate, vom avea : $d^2 = d_0^2 + \frac{1}{4} C_s^2\,\alpha^6$, unde C_s este coeficientul aberațiilor de sfericitate. După stabilirea valorii optime pentru α, se vede că o îmbunătățire a rezoluției se poate obține prin micșorarea lui i. Valoarea lui i nu se poate scădea sub 10^{-12} A, deoarece raportul semnal-zgomot se înrăutățește substanțial, iar imaginea se va pierde în granulația fondului (v. 1.5). O mărire a puterii de rezoluție se va putea face, deci, prin micșorarea lui

C_s, adică prin construirea unor lentile-obiectiv perfecționate și prin utilizarea unor surse de electroni cu strălucire ridicate care să mărească valoarea lui J_c. Înlocuirea clasicului filament de wolfram cu pastile de bor-lantan mărește strălucirea tunului electronic, iar o mărire de mii de ori a strălucirii se realizează în tunul electronic cu emisie de cîmp. Cu un astfel de tun, încă în 1970 A. V. Crew a obținut în sistemul STEM [1] o rezoluție de 13 Å.

Unul din factorii care limitează puternic rezoluția, dacă nu este bine controlat, este astigmatismul despre care se va vorbi la paragraful 3.2.

1.5. Zgomotul

Vizionarea unui preparat (sp.) plat și uniform la microscopul SEM nu dă pe ecran o luminozitate uniformă : ecranul va apare acoperit cu un soi de granulație (fig. I-14) care poartă denumirea de *zgomot*. Cu alte

Fig. I-14 : Imaginea zgomotului fotografiată la SEM.

[1] Secondry transmision electron microscopy.

Scanned with OKEN Scanner

cuvinte numărul de electroni secundari care ajung la detector nu este strict identic în toate punctele preparatului (sp.), chiar dacă toate au aceleași proprietăți de emisie. Dacă numărul de electroni secundari proveniți dintr-un punct al obiectului și înregistrați de detector este n, este bine cunoscut faptul că acest număr poate prezenta fluctuații statistice în valoare de $\sqrt{n}$. Evident, *zgomotul* care însoțește imaginea oricărui preparat (sp.) va deteriora cu atît mai puțin imaginea cu cît raportul dintre valoarea semnalului n și cea a zgomotului $\sqrt{n}$, va fi mai mare. Cum $\frac{n}{\sqrt{n}} = \sqrt{n}$, se vede că la valorile mici ale lui n, calitatea imaginii scade repede. De aceea, o emisie secundară slabă a preparatului (sp.), o colectare neeficientă a electronilor secundari de către detectori sau o intensitate mică a fluxului incident de electroni determină o imagine cu *zgomot* ridicat.

Este evident că n scade cu creșterea vitezei de baleiere. De aceea, pentru o imagine de calitate timpul de baleiere a suprafeței vizionate trebuie să fie de cel puțin cîteva zeci de secunde (40—50 sec). În afara tipului de *zgomot* produs la emisia și colectarea electronilor secundari, granulația pe ecran mai apare și datorită *zgomotului* electric al instalației. De exemplu, pe măsură ce se mărește amplificarea fotomultiplicatorului, crește granulația imaginii pe ecran. În fig. I-14 se vede imaginea zgomotului care apare pe ecranul TC al SEM-ului, în lipsa specimenului, la valori mari ale amplificării fotomultiplicatorului.

2. APARATURA ÎN BALEIAJ

2.1. **Microscopul SEM**

Microscopul electronic SEM, chiar atunci cînd se constituie ca anexă a microscopului electronic convențional de transmisie (CEM) *, este format în principal din aceleași elemente, ale căror descriere și rol le dăm mai jos foarte sumar.

Coloana este vidată la 10^{-5} torr și conține sistemul optic de formare a fasciculului incident de electroni alcătuit din :

— tunul electronic, care generează electronii prin aducerea la incandescență a unui filament de wolfram, a cărui încălzire este controlată de un potențiometru (*filament emission* ** — în lb. engleză). Intensitatea electronilor care trec de catod (fig. I-15), este controlată cu ajutorul unui potențiometru ce variază tensiunea de negativare dintre catod și filament („Gun baias“ — în lb. engleză). Electronii sînt apoi accelerați de potențialul pozitiv al anodului, care poate fi reglat continuu sau în trepte de la cîțiva KV la cîteva zeci de KV.

---

* CEM = Conventional electron microscope.

** Cu rare excepții, denumirile în limba engleză date pentru diferitele comenzi, sînt aceleași pentru toate microscoapele electronice în baleiaj. Noi am lucrat pe microscopul JEM-100 C/ASID4 fabricat de firma JEOL.

Scanned with OKEN Scanner

— lentilele electromagnetice, *condensor* și *obiectiv* și apertura de limitare a fasciculului care transformă electronii proveniți din tunul electronic într-un fascicul fin. Curentul din condensor variază diametrul și intensitatea fasciculului incident (potențiometrul, *spot size*, în lb. engleză), iar curentul din obiectiv focalizează imaginea (de obicei 3

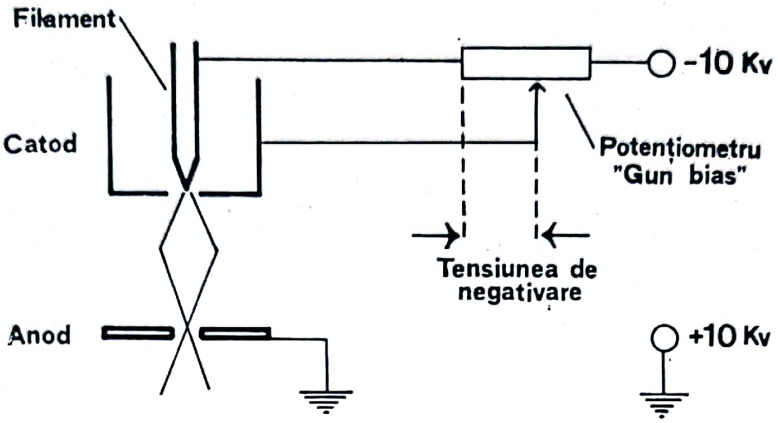


Fig. I-15

potențiometre „coarse", „medium" și „fine" de la focalizarea grosieră la cea fină). Apertura de limitare poate fi centrată mecanic din afara coloanei. Pot fi 3 sau 4 aperturi de dimensiuni diferite ce se pot schimba în timpul lucrului.

În coloană se mai află :

a) stigmatorul, care este un dispozitiv electromagnetic ce compensează neuniformitățile cîmpului magnetic al lentilei, prin suprapunerea unui cîmp magnetic egal și de sens contrar peste neuniformitățile originale. Reglarea astigmatismului se execută din două potențiometre ;

b) bobinele pentru baleierea fasciculului de electroni pe suprafața specimenului. În aceste bobine se introduc impulsuri de curent în dinți de fierăstrău. Amplitudinea impulsurilor (controlată de obicei din două potențiometre) determină valoarea măririi imaginii, iar frecvența lor determină viteza de baleiere, precum și numărul liniilor de baleiaj de pe suprafața baleiată (cadru). Viteza de baleiere poate fi variată de la 0,5 sec/cadru pînă la cîteva sute de secunde pe cadru. La viteze atît de mici de baleiere imaginea nu mai poate fi reconstituită de creierul uman. De aceea se folosește un tub catodic de mare remanență, la care substanța de pe ecran rămîne fluorescentă mult timp după trecerea spotului electronic. Pentru a ușura și mai mult reconstituirea imaginii de către privitor, unele microscoape în baleiaj au și posibilitatea baleierii rapide a unui cadru micșorat, ce poate fi la rîndu-i deplasat pe suprafața ecranului, deci și a obiectivului, folosind două potențiometre („Positioning") ;

c) detectorul (fig. I-16), format din electrozi de colectare și accelerare și dintr-un scintilator, care, sub bombardamentul electronilor secundari, emite semnale luminoase, transformate în semnale electrice de către fotomultiplicator. Cu ajutorul unui potențiometru („Gain") se poate mări tensiunea pe plăcile fotomultiplicatorului, fapt ce produce o creștere a contrastului imaginii ;

Scanned with OKEN Scanner

d) goniometrul, este un dispozitiv mecanic de mare finețe care rotește și înclină preparatul (sp.) față de direcția fluxului incident de electroni ;

e) bobinele de deplasare electrică a imaginii, controlate de două potențiometre („Image Shift"), ce permit o deplasare a cîmpului vizual în limite înguste ;

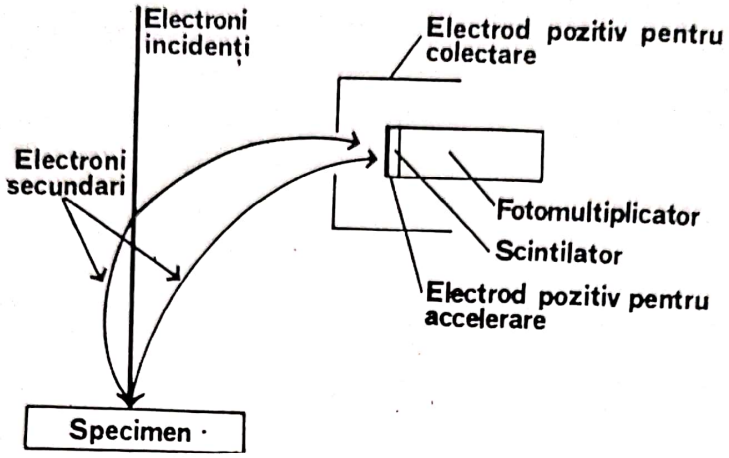


Fig. I-16

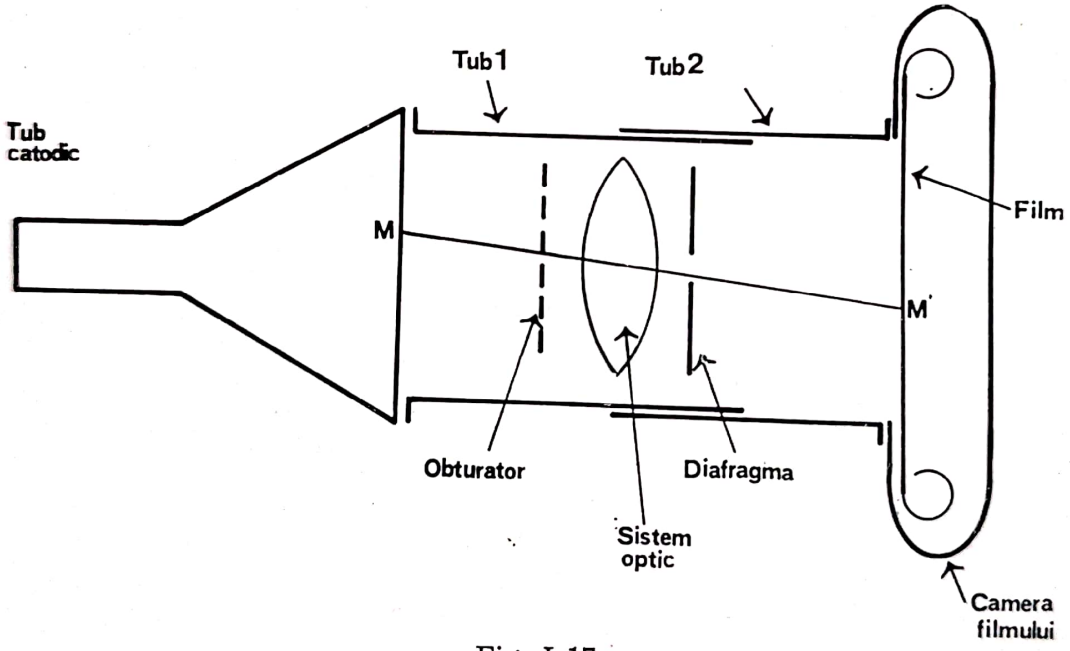


Fig. I-17

f) sistemul de deplasare mecanică a specimenului.

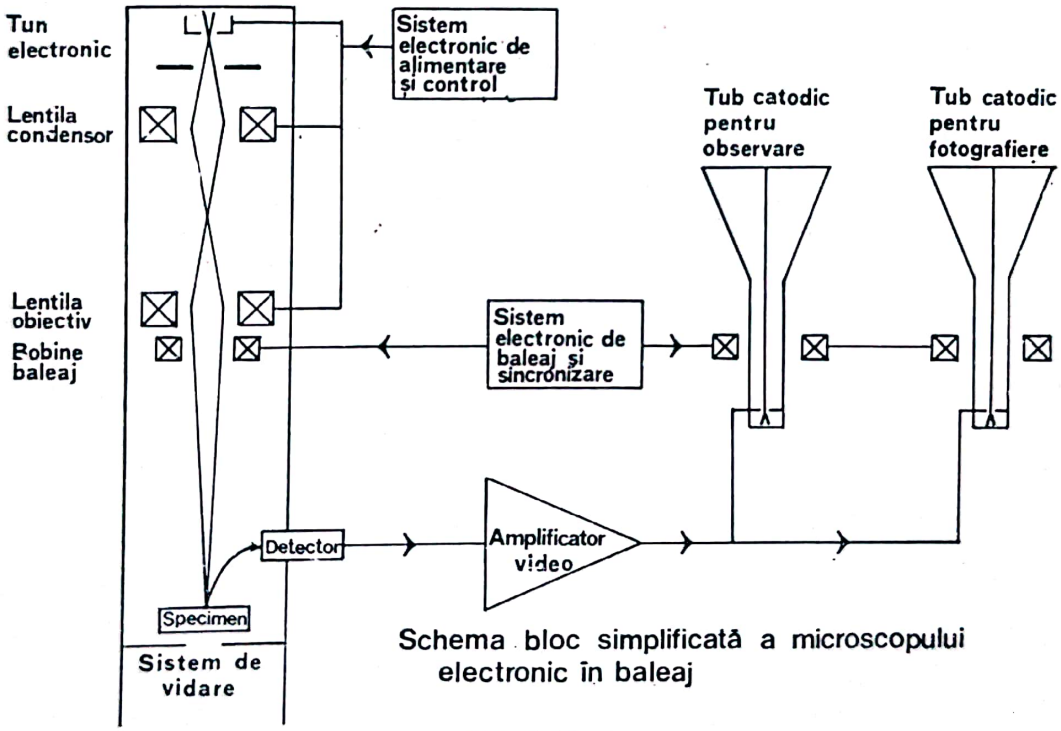
Sistemul de vid, care permite realizarea vacuumului în coloană, necesar pentru deplasarea liberă a electronilor, se compune dintr-o pompă de vid preliminar (pompă rotativă), o pompă de vid secundar (pompă de difuzie), valve manuale, magnetice și pneumatice și, în fine, indicatoare de vid (joje cuplate cu vacuumetre).

Sistemul electronic este format din alimentatoare stabilizate, generatoare de înaltă tensiune, amplificator video etc. Pe lîngă că asigură controlul tuturor dispozitivelor electronice menționate ale coloanei, sistemul

Scanned with OKEN Scanner

electronic permite potrivirea optimă a contrastului și luminozității imaginii prin manevrarea potențiometrelor respective. De menționat că valoarea contrastului se poate varia în trepte din fotomultiplicator (potențiometrul „gain") și continuu din potențiometrul de contrast menționat mai sus (care variază coeficientul de amplificare al amplificatorului video). O mărire substanțială a contrastului detaliilor se realizează prin suprimarea componentei continui a semnalului video și prin amplificarea numai a componentei alternative. Suprimarea componentei continui modifică însă perspectiva spațială a preparatului (sp.) (fig. II-1 și II-2).

Sistemul de fotografiere se compune din : a) tub catodic cu persistență scurtă și b) aparatul foto propriu-zis (fig. I-17), căruia i se pot racorda formate diferite de pelicule prin schimbarea camerei filmului. Să observăm că, spre deosebire de microscopul electronic convențional (CEM) [1], unde imaginea se formează (și se fotografiază) simultan în toate punctele ei, în microscopul SEM, punctele se constituie în imagine succesiv, astfel că, pentru aceeași luminozitate a celor două tipuri de imagini, fotografierea la SEM durează un timp mai îndelungat decît la CEM. Controlul focalizării liniei de baleiaj (M) (fig. I-17) de pe ecran, pe film (M′), se face prin înlocuirea camerei filmului cu un ecran de sticlă



Schema bloc simplificată a microscopului electronic în baleaj

Fig. I-18

mată (anexă a aparatului foto). Prin deplasarea tubului 2 față de tubul 1, se caută poziția pentru care M′ este perfect *focusat,* după care tubul 2 se blochează și se montează la loc camera filmului.

Exponometrul este un dispozitiv electronic care indică atît valoarea luminozității imaginii cît și a contrastului ei. Acest tip de expono-

[1] Conventional electron microscopy.

Scanned with OKEN Scanner

metru diferă de cel uzual, prin faptul că își culege informațiile din semnalele electrice ale imaginii, înainte ca ele să se transforme în imagine pe ecranul tubului catodic.

În fig. I-18 se dă schema bloc a SEM.

2.2. Aparatura de metalizare

Preparatele (sp.) neconducătoare de electricitate, cum sînt cele biologice, pe lîngă o emisie secundară slabă (cu consecințe dezastruoase asupra raportului semnal/zgomot) (v. 1.5), se încarcă electric deoarece electronii incidenți pe preparat (sp.) se scurg greu la pămînt. În zonele cu acumulare de electroni se creează cîmpuri electrostatice care provoacă perturbări haotice atît în ritmul baleierii cît și în emisia secundară. Sarcinile electrice astfel acumulate pe preparat (sp.) provoacă deplasări și deformări ale imaginii, contraste anormale (fig. I-19), linii

Fig. I-19 : Imagine SEM care prezintă contraste anormale datorită lipsei de metalizare a preparatului. Mărire 1 400 x.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

și benzi pe imagine. Pentru îmbunătățirea conductibilității electrice și a emisiei secundare, pe suprafața preparatului (sp.) se depune un strat fin de metal, cum ar fi : Au, Cr, aliaje Au-Pd, sau Pt-Pd. În cazul unor preparate (sp.) cu relief foarte complicat, se depune mai întîi un strat de carbon. Grosimea totală a depunerilor nu trebuie să fie prea mare întrucît pot acoperi detaliile preparatului (sp.). Se consideră că pentru măriri de pînă la 3 000 stratul depus nu afectează rezoluția dacă grosimea lui nu depășește 600 Å. Depunerea se face prin evaporarea în vid a carbonului dintr-un arc voltaic și a aurului de pe filamentul de wolfram îndoit în formă de V, în vîrful căruia se plasează un călăreț de aur (tablă sau fir), (fig. I-20). Aprecierea relativă a grosimii carbonului depus se face (în lipsa unui dispozitiv rezistiv), prin plasarea în incintă a unei plăcuțe de porțelan pe care s-a depus o picătură de ulei de difuzie. Prin evaporare, carbonul se depune și înnegrește porțelanul, zona picăturii rămînînd albă. Din contrastul respectiv se poate face o apreciere aproximativă a depunerii. Grosimea metalului depus se poate controla mult mai exact. Considerînd filamentul, în formă de V, o sursă punctiformă, avem relația : $t = \frac{m}{4\pi\rho d^2}$ unde t este grosimea stratului depus, ρ este densitatea metalului depus, m este masa de metal evaporată, d este distanța dintre filament și preparat (sp.) (fig. I-21). Pentru o grosime t, se cîntărește cantitatea m de metal care rezultă din calcul și se evaporă complet. Pentru ca metalul să se depună cît mai

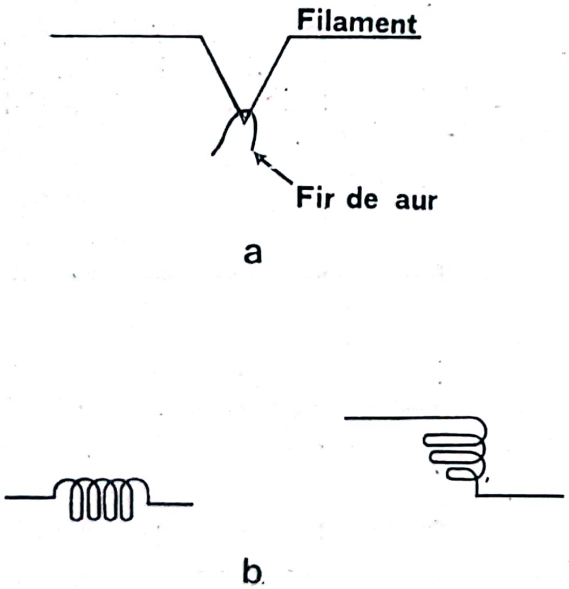


Fig. I-20

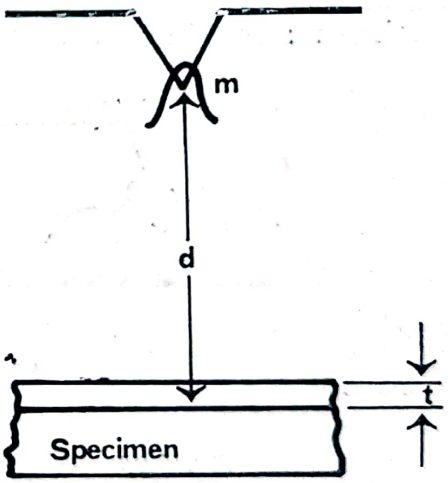


Fig. I-21

uniform în toate meandrele preparatului (sp.), acesta este rotit și înclinat prin mișcări oscilatorii în tot timpul evaporării. Prin înclinare însă, distanța d variază mult ; de asemenea și unghiul de depunere a metalului. De aceea formula dată poate fi folosită doar pentru a oferi un caracter de reproductibilitate metalizării în cazul în care se păstrează nemodificate caracterele mișcării preparatului (sp.). Mai întîi se evaporă

carbonul, apoi se evaporă și metalul care, în cazul *Au* sau *Pt* mai întîi trece prin faza de topire în timp ce în cazul *Cr*, sublimează. Față de *Pt*, *Au* are avantajul că nu se aliază cu wolframul, așa cum se întîmplă cu *Pt* și *Pd* care prin aliere distrug filamentul. De amintit că un filament nefolosit de wolfram trebuie mai întîi curățat prin încălzire la roșu în vid, fără preparat și fără metal, astfel încît să elimine impuritățile de pe suprafața lui, cum ar fi oxidul de wolfram, care altfel s-ar depune pe preparat. Înainte de plasarea pe filament, metalul trebuie bine degresat, iar în perioada de topire și inclusiv la începutul evaporării, între sursă și preparat trebuie introdus ecranul mobil care colectează impuritățile provenite din sursă. Pentru metalele ce nu pot fi aduse în formă de benzi sau fire, se folosesc coșulețe sau spirale din wolfram (fig. I-20 b), pentru care, însă, formula dată pentru valoarea lui *t* nu mai este valabilă, ea folosind totuși, pentru asigurarea reproductibilității grosimii depuse. Preparatul este introdus în incinta de metalizare pe suportul metalic (holder) cu care va fi introdus și în microscopul SEM spre vizionare. Lipirea pe suport a preparatului (firește prealabilă metalizării) se face cu o pastă de argint, care asigură legătura electrică între preparat și suportul metalic, permițînd scurgerea electronilor la pămînt (fig. I-22). În cazul preparatului sub formă de sediment fin, el se depune pe suportul metalic ca un frotiu.

Metalizatorul este o instalație de evaporare sub vid, dotată cu o incintă vidată la 10^{-5} torr de către un sistem de pompă de difuzie — pompă rotativă ; în incintă sînt două perechi de electrozi care susțin electrozii de carbon și filamentul de wolfram. Un alimentator de putere poate fi comutat pe rînd pe fiecare din cele două perechi de electrozi, permițînd evaporări succesive fără introducerea aerului în incintă. În incintă se mai află un dispozitiv care rotește electric preparatul, și-l înclină manual în raport cu direcția filament-specimen.

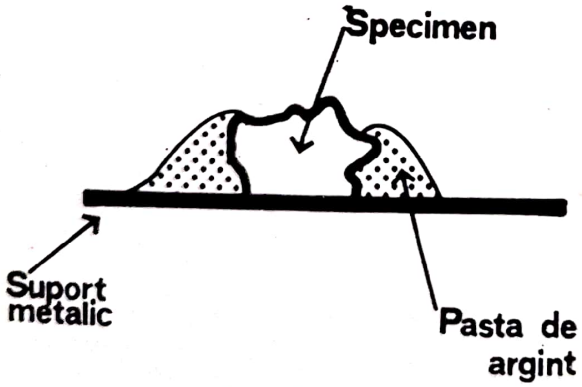


Fig. I-22

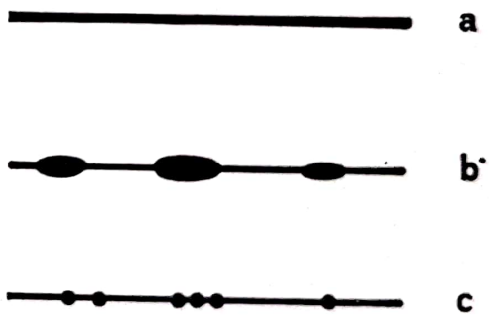


Fig. I-23

3. CONDIȚIILE NECESARE OBȚINERII UNEI IMAGINI SEM DE BUNĂ CALITATE

O imagine bună este bine focalizată, are un contrast optim și o granulație cît mai mică. De asemenea, o imagine bună, redă bine detaliile la măriri mari și profunzimea la măriri mici. În fine, imaginea nu trebuie să prezinte distorsiuni, dungi, crăpături etc., care ar da informații false despre preparat.

Scanned with OKEN Scanner

Dăm mai jos cîteva din condiţiile care în mod sigur pot deteriora imaginea dacă nu sînt corespunzător îndeplinite.

3.1. Focalizarea

Se poate face uşor la viteza maximă de baleiere pe un cadru micşorat, dar experienţa arată că focalizarea cea mai precisă şi mai rapidă se obţine la viteze mici de baleiere, cînd pe ecran nu se mai integrează imaginea ci apare doar linia de baleiaj care coboară încet. Fireşte linia de baleiaj conţine punctele imaginii, iar focalizarea exactă se traduce prin aceea că aceste puncte se precizează de-a lungul liniei de baleiaj. Cu cît linia coboară mai lent, cu atît mai uşor se poate stabili focalizarea cea mai bună, manevrînd neîncetat în ambele sensuri butonul potrivit pentru focalizare. În fig. I-23 a, b, c, se văd momentele trecerii de la defocalizare completă la focalizare. În linia *b*, care reprezintă o uşoară defocalizare, punctele care apar distinct în linia *c* se lăţesc şi se confundă. De regulă la microscopul SEM, imaginea se focalizează la o treaptă de mărire superioară celei la care are loc fotografierea.

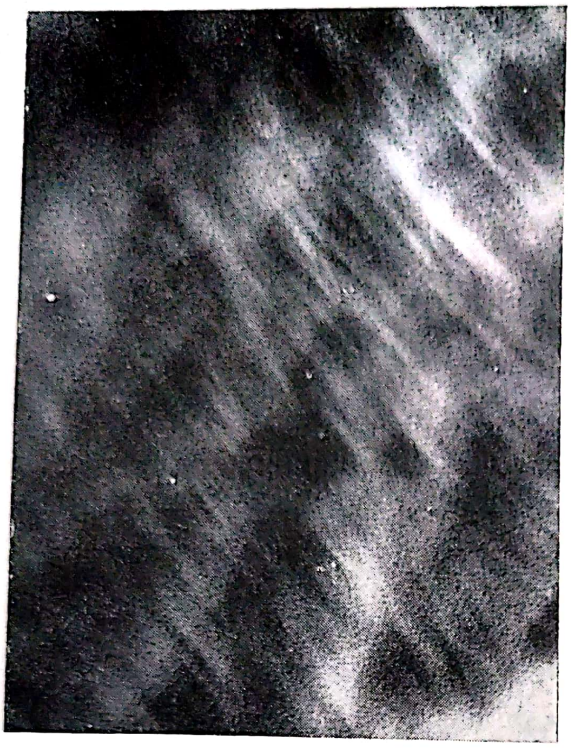
3.2. Astigmatismul

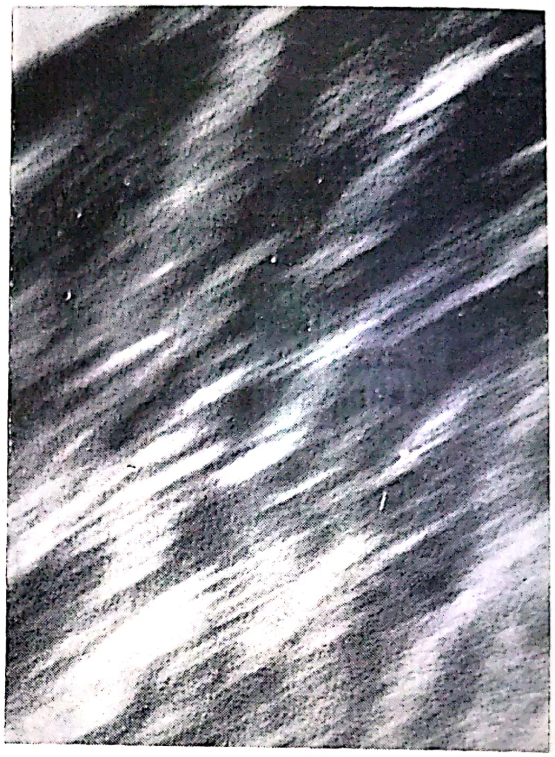
Se datoreşte neuniformităţii cîmpului magnetic, ceea ce face ca lentila să nu mai aibă o distanţă focală unică. Astfel, punctele preparatului nu se vor clarifica toate în acelaşi plan şi imaginea nu va fi niciodată perfect clară şi va prezenta o direcţie de focalizare. Există două planuri extreme de focalizare, iar direcţiile de focalizare din cele două planuri se află la 90°, (fig. I-24 *a* şi *b*). Prin urmare, dacă pe ecran avem imaginea *a*, rotind uşor butonul de focalizare vom obţine imaginea *b*. În exteriorul domeniului determinat de aceste două poziţii, imaginea devine complet neclară, iar în interiorul lui este mai mult sau mai puţin neclară în funcţie de mărire (avînd în vedere că efectul astigmatismului creşte rapid odată cu mărirea). Astigmatismul se compensează la măriri mari, de cel puţin ×10 000, deoarece la măriri mai mici nu se evidenţiază bine. Deci, după ce s-au găsit cele două planuri extreme (fig. I-24 *a* şi *b*), folosind în acest scop viteza maximă de baleiere pe cadru redus, se duce butonul de focalizare pe poziţia mediană faţă de poziţiile extreme şi se clarifică imaginea din cele două potenţiometre ale stigmatorului. În fig. I-24 *c* se vede imaginea cu astigmatismul corectat.

3.3. Curăţenia coloanei şi a aperturilor

Cu timpul, datorită nenumăratelor introduceri de specimene în coloana microscopului SEM, încep să se adune impurităţi : praf, scame, resturi de specimene etc. Uleiul din pompa de difuzie şi din cea rotativă pătrunde în coloană în cantităţi foarte mici, dar — în timp — se depune suficient pentru a produce perturbaţii, în special, pe aperturile de limi-

Scanned with OKEN Scanner





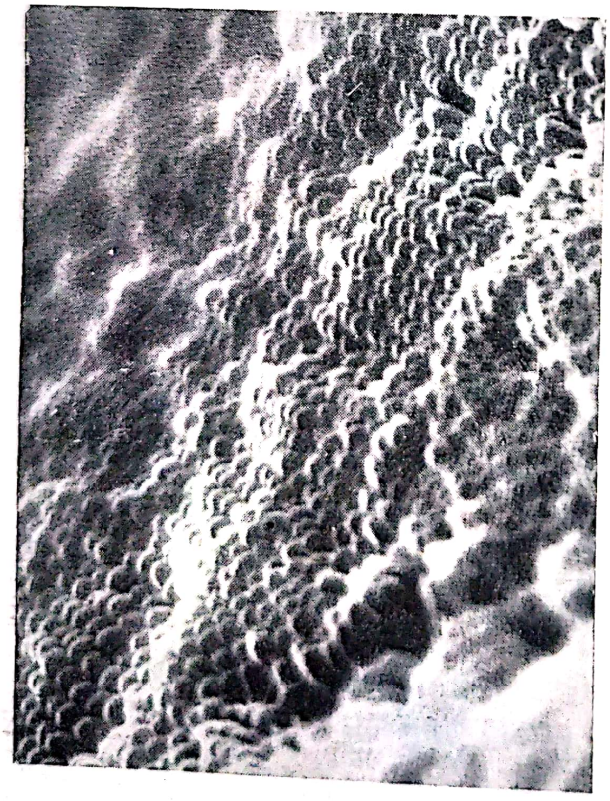


Fig. I-24 *a)* și *b)* : Imagini SEM cu astigmatism, defocalizată ; c) : imagine SEM fără astigmatism, focalizată. Mărire directă 20 000 x.

Scanned with OKEN Scanner

tare a cîmpului. Toate aceste impurităţi dielectrice creează, prin încărcare cu electroni, cîmpuri parazite care perturbă funcţionarea microscopului. Spre exemplu, uleiul de pe aperturi creează un astigmatism variabil în timp scurt care nu mai permite o compensare a lui cu ajutorul stigmatorului, fapt ce înrăutăţeşte rezoluţia. De aceea, curăţirea periodică a elementelor coloanei şi a aperturilor se impune cu necesitate.

3.4. Azotul lichid

Uleiul care pătrunde în coloană, contaminează preparatul micşorîndu-i substanţial rezoluţia. În fig. I-25 a şi b se arată 2 fotografii, luate la 10 minute una faţă de alta, şi se observă gradul de alterare a imaginii. Pentru micşorarea contaminării, în jurul preparatului este plasată o apertură răcită cu azot lichid, un fel de capcană de ulei. Menţinerea nivelului azotului lichid în rezervorul capcanei, în timpul lucrului, face ca după 10 minute imaginea să nu prezinte semne de alterare. Trebuie menţionat faptul că efectul de contaminare apare ca urmare a interacţiunii dintre fasciculul incident de electroni şi uleiul rezidual, astfel că, dacă filamentul tunului este oprit, preparatul poate fi ţinut mult timp în coloană fără a se contamina. În afară de deteriorarea rezoluţiei, contaminarea întunecă imaginea deoarece micşorează emisia secundară a suprafeţei preparatului.

3.5. Diametrul aperturii

Intensitatea fasciculului de electroni creşte odată cu mărirea diametrului aperturii de limitare a cîmpului, iar peste o anumită valoare a diametrului, rezoluţia microscopului se va înrăutăţi datorită defectelor lentilelor electromagnetice (v. 1.4), care se vor manifesta cu pregnanţă. Mărirea intensităţii fasciculului incident creşte riscul distrugerii preparatului (fig. I-26), în acelaşi timp însă creşte raportul semnal/zgomot ceea ce are efecte favorabile asupra calităţii imaginii. Mărirea diametrului aperturii, duce totodată şi la micşorarea adîncimii de focalizare a microscopului SEM (fig. I-27).

3.6. Tensiunea de accelerare

Tensiunea de accelerare nepotrivită duce la apariţia încărcării cu electroni a preparatului (benzi, dungi, deplasări). Micşorarea tensiunii poate elimina complet încărcarea, însă pentru menţinerea contrastului este necesară mărirea amplificării fotomultiplicatorului ceea ce măreşte zgomotul. Această situaţie este preferabilă imaginii cu efecte de încărcare, mai ales că se poate micşora zgomotul astfel : se micşorează contrastul electronic atît cît încă se mai pot obţine prin metode fotografice, fotografii de contrast normal copiate după negative foarte moi. S-a arătat în paragraful 1.3. că micşorarea tensiunii de accelerare permite o evidenţiere mai bună a detaliilor (fig. I-9 şi I-11), deşi rezoluţia micro-

Scanned with OKEN Scanner

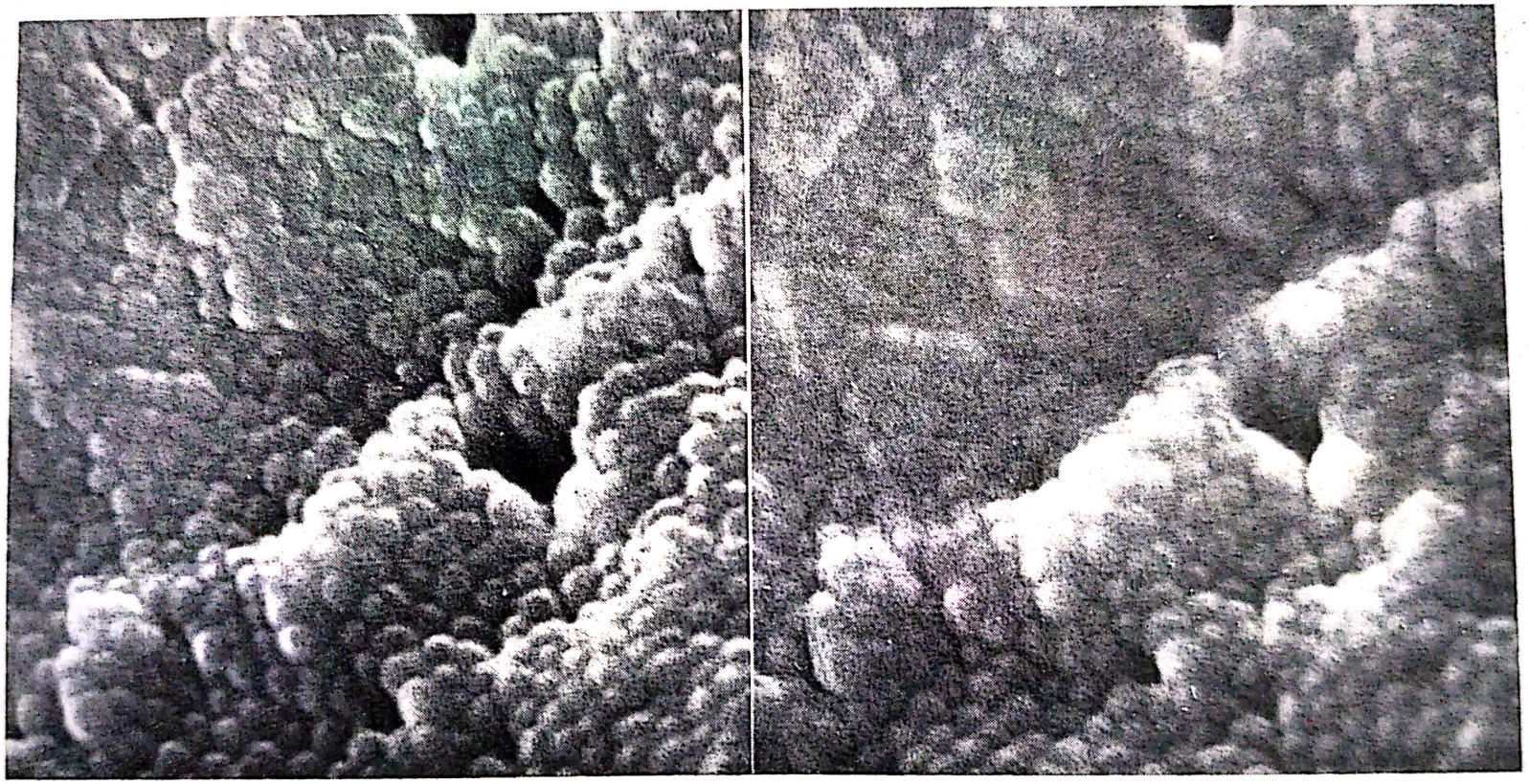


Fig. I-25 : a) Imagine SEM fotografiată în condiţiile folosirii azotului lichid la apertura de răcire. b) Imagine SEM fotografiată după 10 minute de şedere în coloană sub bombardament electronic, fără azot lichid la apertura de răcire. Mărire directă 20 000 x.

Scanned with OKEN Scanner

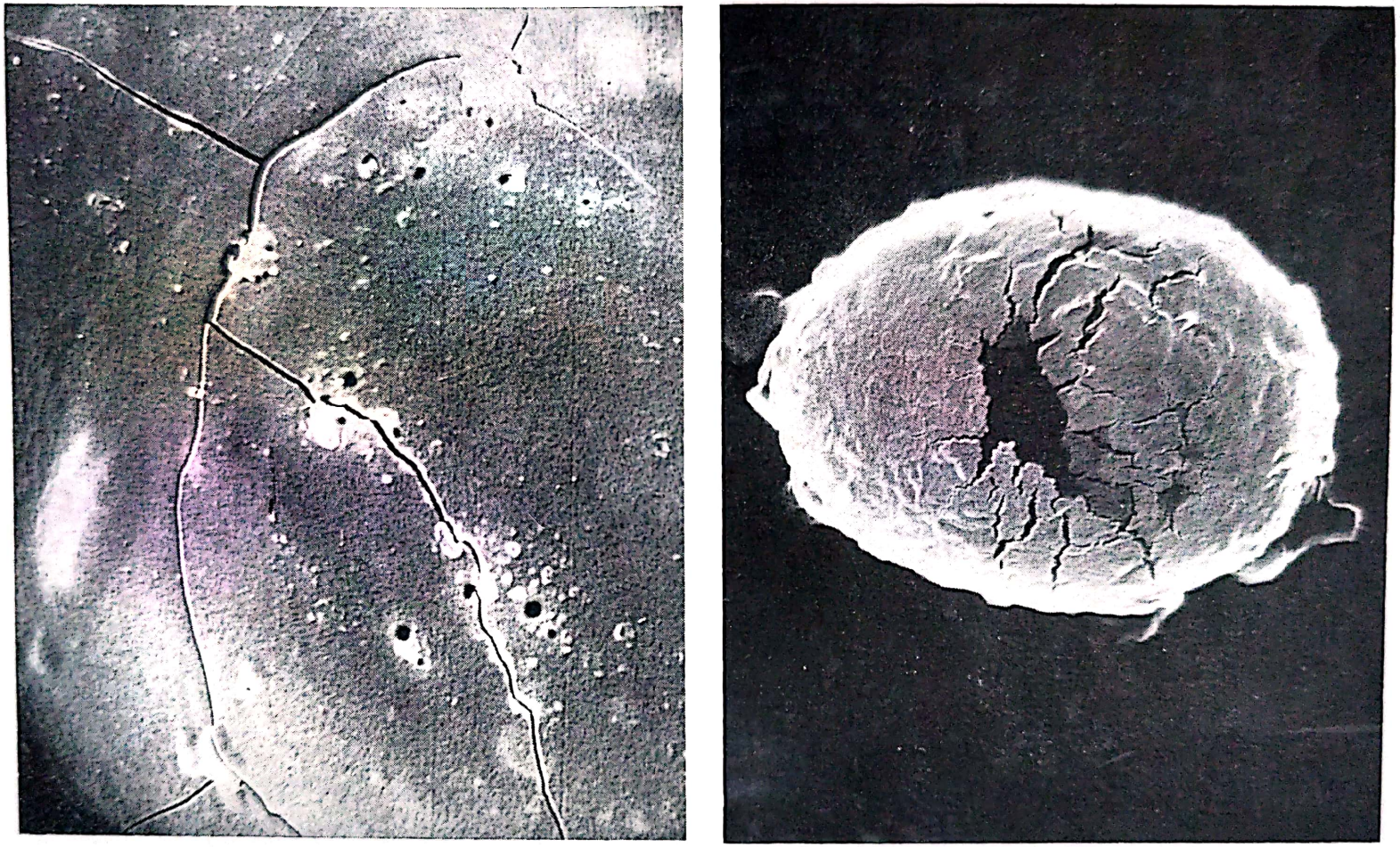


Fig. I-26 : Imagini SEM care ilustrează efectul distrugerii preparatului prin bombardament electronic.

Scanned with OKEN Scanner

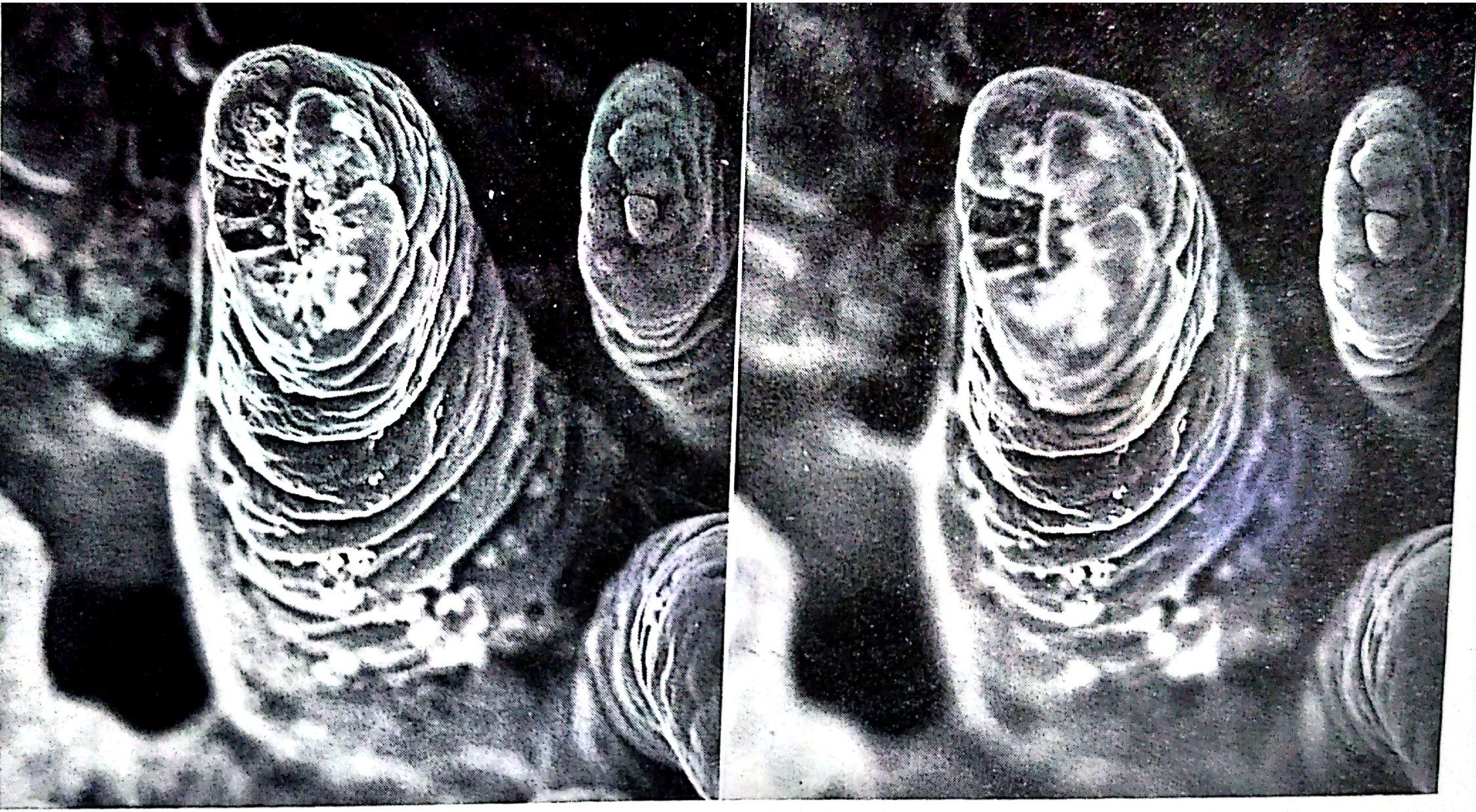


Fig. I-27 : Imagini SEM care ilustrează efectul diametrului aperturii asupra adîncimii de focalizare, a) diametrul aperturii este de 100μ, b) diametrul aperturii este de 400μ.

Scanned with OKEN Scanner

scopului se micşorează putînd ajunge pînă la 300—500 Å (vezi formula de la paragraful 1.4). Firește, cînd dimensiunea detaliilor este de ordinul a cîtorva sute de angstromi, trebuie mărită tensiunea de accelerare. Trebuie ţinut seama de faptul că mărirea tensiunii crește riscul distrugerii specimenului pe de o parte, iar pe de altă parte se accentuează efectul de margine (v. 1.3).

3.7. Metalizarea

Metalizarea foarte slabă, determină contraste anormale (fig. I-18) și încărcări electrice pe suprafaţa preparatului cu efectele sale negative asupra imaginii. Metalizarea prea puternică deşi dă o imagine fără zgomot alterează rezoluţia preparatului. Metalizarea optimă se stabilește experimental pentru preparatul dat, astfel : se micşorează grosimea stratului depus, atît cît să se mai poată găsi o tensiune de accelerare suficient de mică încît să dispară efectele sarcinilor spaţiale, în condiţiile unui zgomot acceptabil.

3.8. Fotografierea

Reglarea aparatului fotografic : periodic se controlează (şi dacă este cazul se ajustează) camera fotografică astfel ca linia de baleiaj de pe ecran să fie bine focusată pe filmul fotografic (vezi „sistemul de fotografiere“ de la paragraful 2.1).

Viteza de baleiaj. În paragraful 2.1. s-a arătat că viteza de baleiaj mare, evidenţiază zgomotul. De aceea, pentru fotografiere se alege o viteză de cel puţin 50 sec/cadru.

Etalonarea exponometrului este obligatorie şi stabileşte în funcţie de procedeul de developare, de sensibilitatea filmului, de viteza de baleiaj şi de diafragmă, care trebuie să fie indicaţiile exponometrului pentru a obţine un negativ cu un contrast şi o luminozitate corespunzătoare. De remarcat că, faţă de exponometrele obişnuite pentru care se etalonează doar luminozitatea, în cazul SEM exponometrul are doi parametri independenţi care trebuie etalonaţi, contrastul şi luminozitatea, de al căror raport just depinde calitatea fotografiei.

Procedeul de developare

Întrucît pentru micşorarea la maximum a zgomotului trebuie micşorat electronic contrastul pînă la limita admisă de procedeele fotografice (paragraful 3.6), tehnica fotografică în cazul SEM va fi :

— negative foarte moi, developate în revelator de granulaţie mică (fină) la temperaturi de maximum 20°C, filmul agitîndu-se foarte rar în timpul developării ;

— negativele se copiază pe hîrtie contrast şi ultracontrast, folosindu-se timpi scurţi la expunere şi lungi la developare, iar dacă este cazul se vor folosi şi revelatori contrast.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. Broers A. N., *A New High Resolution Reflection,* Scanning Electron Microscope, Rev. Sci. Instr. 40, 1040—1045 (1969).
2. Crew A. V., *Scanning Electron Microscopes : Is High Resolution Possible ?* Science 154, 729—738 (1966).
3. Crew A. V., Isaacson M., Johnson D., *A simple Scanning Electron Microscope,* Rev. Sci. Instr. 40, 241—246 (1969).
4. Crew A. V., *A High Resolution Scanning Electron Microscope, Scientific American,* 224 (4) April 26—35 (1971).
5. Everthart E. T., Hayes T. L., *The Scanning Electron Microscope, Scientific American,* 226, No 1, 54—69 (1972).
6. Hayes T. L., *Scanning Electron Microscope Techniques in Biology.* In Advancee Techniques in Biological Electron Microscopy. Ed. Koehler J. K. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York (1973).
7. Heinrich K. F. L., Fiori C., Yakowitz H., *Image Formation Technique for Scanning Electron Microscopy and Electron Probe Microanalysis,* Science 167, 1129—1131 (1970).
8. Hall E. C., *Introduction To Electron Microscopy.* Mc Graw-Hill Book Company (1966).
9. Holland L., *Vacuum Deposition of Thin Films* (1956).
10. Haanstra H. B., *Stereophotography with the electron microscope,* Philips Bulletin 27, No 8, 231—237 (1966).
11. Pease R. F. W., Nixon W. V., *High Resolution Scanning Electron Microscopy,* J. Sci. Instr. 42, 81—85 (1965).
12. Kimoto S., *The Scanning Microscope As A System,* Jeol News, vol. 10, No. 2 (1972).

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL II

METODE DE OBȚINERE A PREPARATELOR DIN ORGANE HEMATOPOETICE SPECIFICE PENTRU EVIDENȚIEREA ÎN BALEIAJ (SEM)

4. PRINCIPII GENERALE PRIVIND TEHNICA DE OBȚINERE A PREPARATELOR PENTRU EXAMINAREA ÎN BALEIAJ (SEM)

Microscopia electronică în baleiaj prezentată în primul capitol este diferită de microscopia în transmisie directă, avînd posibilități speciale pentru examinarea preparatelor biologice.

Tehnicile pentru pregătirea materialelor necesare examinării și interpretării, au un caracter cu totul aparte, rezultatul fiind obținerea unor imagini tridimensionale, cu evidențieri multiple în ceea ce privește ultrastructura suprafeței celulare.

În acest scop, tehnicile de obținere a unor preparate de calitate, fără alterări, sînt dificile și controversate, existînd numeroase *rețete* pentru pregătirea materialelor biologice supuse interpretării (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 16).

Avantajul principal al acestor tehnici este dat de calitatea preparatelor în evidențierea microscopică, posibilitatea de a elimina artefactele inerente, durata scurtă a pregătirii preparatelor și costul redus (avantajos) al substanțelor folosite.

Dintre metodele cunoscute, trei sînt mai frecvent utilizate în ultimul timp pe plan mondial (3) (15) și anume :

1) metoda uscării în aer *(air drying)*
2) metoda uscării prin îngheț *(freeze-drying)*
3) metoda uscării în punct critic *(critical point — drying).*

Cei mai importanți factori, care intervin în reușita obținerii unui preparat bun, sînt : tehnica de recoltare, modul de fixare, substanțele chimice folosite, proveniența celulelor, țesutului sau organului, specia.

Într-o lucrare recentă, Polliack (15) ajunge la concluzia că : *depinde mult de metoda de preparare a celulei și în particular de modul de fixare, de utilizare a uscării în prelucrarea celulelor pentru baleiaj (SEM).*

Părerile controversate ale specialiștilor — în utilizarea tehnicilor de obținere a preparatelor (7) (8) (14) (15) (18) — ne-au determinat a încerca, cu posibilitățile noastre, cîteva din metodele recomandate în literatură.

Scanned with OKEN Scanner

În urma rezultatelor obținute, am considerat că metoda uscării în aer *(air drying)* sau, cu modificările noastre, de uscare în vid, poate fi utilizată cu succes, atît pentru a asigura o calitate deosebită a preparatelor, adică se obține evidențierea ultrastructurii în baleiaj, cît și pentru că această metodă este simplă și are un cost redus.

În același timp am utilizat și o altă variantă a uscării în aer, folosind la deshidratare, produsul Freon 113 sau azot lichid care duce și la scurtarea timpului de pregătire a preparatelor (2).

Din testările noastre am ajuns la concluzia extrem de importantă că prin aceste două metode se poate considera că : prima poate fi folosită (în variantă) cu succes în evidențierea celulelor organelor hematoformatoare și ale sîngelui periferic la pasăre, bovine și om, iar a doua pune în evidență foarte bine celulele respective la cabaline, ovine și porcine.

4.1. Modul de recoltare a preparatelor biologice

Recoltarea se poate face din diferite organe, prin *biopsie,* dar noi am recoltat, cel mai des probele imediat după moartea sau sacrificarea animalelor (porțiuni de țesut sau organe de circa 2—3 mm^3).

Pentru pregătirea preparatelor din organele hematoformatoare (porțiuni de țesut, extract celular sau celule) recoltarea se face diferit, în funcție de consistență.

Pentru sînge se folosesc substanțe anticoagulante în cantități și concentrații foarte reduse (heparina, EDTA-Etilen-Diamino-Tetraacetic-Acid, bipotasic).

Utilizînd EDTA tri sau tetrasodic, precum și citrat de sodiu, rezultatele nu au fost mulțumitoare deoarece s-a constatat producerea de alterări importante ale structurii de suprafață la nivelul membranelor celulare.

Heparina s-a utilizat numai la prelevarea materialului biologic la păsări, asupra celorlalte specii avînd un efect oarecum alterativ (5).

În cazul recoltării unor porțiuni de țesuturi s-a folosit serul fiziologic pentru spălare, iar în situații cînd a fost impus transportul probelor s-au folosit mediile sintetice T199 sau Eagle, conservarea în acestea nedepășind o oră.

4.1.1. Preparate din sînge global

Preparatele se obțin, în funcție de specie, prin recoltarea sîngelui din venele cele mai accesibile : venele jugulare, auriculare, vena pintenului, la majoritatea animalelor ; venele ulnare sau axilare la păsări ; vena brahială pentru om.

Pentru preîntîmpinarea procesului de coagulare, în eprubetă sau seringă se introduce o cantitate foarte redusă de substanță anticoagulantă, cele mai bune rezultate fiind date de EDTA, sare bipotasică, sau heparină în dozele uzuale indicate în hematologie.

Scanned with OKEN Scanner

Cantitatea de sînge recoltat nu trebuie să fie mai mare de 5 ml pentru o probă. Imediat după recoltare, sîngele trebuie să fie supus acțiunii de fixare, altfel celulele apar la microscopul de baleiaj alterate sau fără structură suficient de identificabilă.

4.1.2. Preparate din concentrat leucocitar

Obținerea de concentrat leucocitar pentru examinarea în baleiaj a fost posibilă prin adaptarea tehnicii folosite în hematologia clinică.

Metoda, care constă în concentrarea leucocitelor dintr-o probă într-un volum redus, permite examinarea și identificarea unor celule rar întîlnite în sîngele periferic, cum sînt : celulele STEM, celulele blastice și tumorale etc.

Tehnica de obținere a concentratului leucocitar (9) (13) se bazează pe sedimentarea mai rapidă a hematiilor decît față de leucocite și alte elemente rare, exceptînd eritrocitele nucleate ale păsărilor, la care nu este utilizabilă (2).

Se recoltează circa 16—20 ml sînge direct într-o eprubetă sau cu ajutorul unei seringi, în care s-au pus 0,01 g de sare bipotasică EDTA sau 50 u.i. heparină. Cel mai indicat este însă K_2EDTA.

După recoltare, sîngele este agitat pentru a se evita coagularea. Se păstrează 1—2 ore la temperatura de 37°C pentru separarea plasmei. Cu ajutorul unei seringi cu tub și a unei pipete atașată la capăt sau cu o pipetă Pasteur, se aspiră plasma pînă la inelul alb-cenușiu din zona de separare.

— *Alte metode de obținere a leucocitelor pentru evidențiere în baleiaj :*

a) Se dizolvă 310 mg fibrinogen de bovine în 10 ml apă distilată. Din această soluție se ia 1,25 ml, și se amestecă cu 10 ml sînge recoltat. Se pun într-o eprubetă înclinată la 45° timp de o oră la 37°C. După exprimare plasma recoltată conține foarte multe leucocite (după Minor și Burnett) (2).

b) Pentru obținerea granulocitelor — în cazul unor infecții, precum și a altor elemente figurate — o metodă foarte simplă și des utilizată este folosirea lamelelor de sticlă care se introduc în sîngele proaspăt. Pe aceste lamele aderă un număr suficient de celule, care pot fi ulterior prelevate odată cu suportul respectiv.

4.1.3. Preparate din măduva hematopoetică

Obținerea unor preparate din măduvă oferă posibilitatea de punere în evidență a complexului celular, pornind de la celula STEM multipotentă continuînd și cu unele elemente de traziție pînă la celulele adulte. Preparatele din măduvă hematogenă, examinate prin baleiaj, pot da informații deosebite în cazul unor modificări neobservate în leucocitoconcentrat sau sîngele global cu ajutorul microscopiei optice.

Scanned with OKEN Scanner

Acest lucru este valabil pentru microscopia electronoptică de transmisie în unele stări patologice (limfoame, hematosplenomegalii, leucoză sau în unele procese imunopatologice). Locul de elecţie pentru obţinerea unei probe (punctat medular, bipuncţie) este tuberozitatea dorsolaterală a *ileonului* (unghiul extern al *iliumului),* pentru animalele mari ; sternul, la animalele mici şi mijlocii ; creasta internă medio-proximală a tibiei sau sternul, puncţionabil şi la om.

În afară de posibilitatea de a obţine material biologic prin puncţie medulară *in vivo,* se mai poate recolta *suc medular* de la animalele sacrificate sau moarte de scurt timp. Procedeul constă în *forcipresura osului* din teritoriile respective hematoformatoare (stern sau tibie). La recoltarea prin biopuncţie conţinutul medular este absorbit cu seringa, iar după sacrificare, cu pipeta Pasteur. Conţinutul se introduce în mediul artificial Eagle sau T199, aşa cum a fost recoltat, sau cu puţin anticoagulant. În acest mod se produce o diluare a concentratului de măduvă care, apoi, se pipetează rapid şi direct în fixator, picătură cu picătură pînă la obţinerea unui sediment uniform.

4.1.4. **Preparate din limfoganglioni**

Preparatele ce se obţin din ganglionii limfatici oferă, ca şi în recoltarea de măduvă, posibilităţi suplimentare de diagnostic în stări patologice ca : leucoză, metastaze, limforeticulopatii.

Recoltarea materialului se face prin biopuncţie cu ajutorul unui ac gros aspirînd repetat cu seringa, iar după sacrificare sau moarte imediată, prin recoltarea din ganglionii care prezintă modificări anatomopatologice. Prin secţionarea şi presarea lor se absoarbe sucul ganglionar cu ajutorul unei pipete Pasteur care, apoi, se trece în fixator ggt/ggt (picătură cu picătură pentru obţinerea sedimentului necesar).

4.1.5. **Preparate din splină**

Obţinerea conţinutului splenic se poate face prin biopuncţie după stabilirea locului de elecţie, în funcţie de specie.

În cazul sacrificării sau morţii animalului (pentru păsări conţinutul se obţine numai prin sacrificare) splina se secţionează, iar prin presare, sucul (lichidul) respectiv, se recoltează cu pipeta. După această operaţie, conţinutul este pipetat rar în fixator pentru obţinerea unui sediment uniform.

4.1.6. **Preparate din bursa lui Fabricius**

Preparatele obţinute la păsări din bursa lui Fabricius oferă unele completări pentru diagnosticul în anumite viroze.

Recoltarea se face după sacrificarea păsării, conţinutul obţinîndu-se prin secţionarea şi presarea bursei şi aspirîndu-se cu pipeta, după care este picurat direct în fixator pentru sedimentare uniformă. În ca-

Scanned with OKEN Scanner

zul bursei lui Fabricius la păsări, cît şi pentru ganglioni şi splină, la celelalte animale, se pot recolta şi porţiuni de ţesut de circa 2—3 mm^3; tot aşa de bine pot fi examinate în baleiaj, dar după o tehnică deosebită de pregătire. Aceasta constă în spălarea imediată după recoltare cu ser fiziologic şi cu mediu Eagle sau T199 a porţiunii respective de ţesut trecîndu-se imediat în substanţa fixatoare mărind în schimb timpul de acţionare a fixatorului.

4.1.7. Preparate din lichidul peritoneal

Preparatele se obţin recoltînd lichidul peritoneal prin puncţie abdominală, tehnica fiind cea uzuală. Lichidul obţinut prin aspirare cu seringa este picurat imediat în fixator în picături rare pentru sediment uniform.

4.2. Tehnica de pregătire a celulelor recoltate

După recoltare, probele se supun unor operaţii de pregătire care permit în final, evidenţierea cît mai corectă a elementelor celulare sau de ţesut la microscopul electronic de baleiaj.

Metodele utilizate au avantajul unei rapide pregătiri pentru examinare, iar cercetările ce se pot întreprinde permit o nouă abordare în studiul celulelor a morfologiei structurii de suprafaţă, a raporturilor lor, în ţesuturi sau în organe, în stare normală sau patologică la om şi animale.

Tehnica de pregătire a materialului biologic prezintă şi unele neajunsuri mai ales în ceea ce priveşte prezervarea corectă şi (în totdeauna) a unor elemente de arhitectură celulară sau tisulară precum şi eliminarea completă a unor artefacte. În afara modului de cum şi cît de corect este recoltat preparatul biologic, factorul cel mai important în obţinerea unor imagini de calitate în baleiaj îl reprezintă acţiunea de fixare a unor substanţe chimice (element extrem de variabil) precum şi celelalte operaţii anterioare examinării (8) (15).

În tehnica de pregătire este important, de asemenea, organul şi specia, fiecare avînd particularităţi deosebite, ceea ce necesită o laborioasă testare. În cadrul acestui punct vom prezenta întreaga succesiune a operaţiilor utilizate de noi şi alţi specialişti, precum şi unele recomandări speciale, necesare în fazele de lucru.

Pentru că rezultatul final în microscopia electronică SEM este imaginea tridimensională şi fotografierea ei, iar alterările celulare pot duce la interpretări eronate, considerăm necesar să prezentăm în tabelul nr. 1 astfel de posibile alterări şi cauzele lor.

Scanned with OKEN Scanner

Tabel nr. 1

Alterări posibile ale unor preparate recoltate (numai pentru celule)

Constituent celular	Componentul	Cauza alterării	
		în microscopia de transmisie	în microscopia de baleiaj
Membrana celulară	Structură de suprafață (microvili)	1, 2, 3, 4, 5, 6.	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10.
Citoplasma	Mitocondrii	1, 2, 3, 5.	(pentru sediment mitocondrial)
	Lizosomi	1, 3, 5.	
	Aparat Golgi	1, 2, 3, 5.	
	Centrozom	1, 3, 5.	
	Ribozomi și polizomi	1, 3, 5.	
	Reticul endoplasmic neted	1, 2, 3, 5.	
	Reticul endoplasmic rugos	1, 3, 5.	
Nucleul	Membrană nucleară	1, 2, 3, 4, 5, 6.	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.
	Porii membranei nucleare	1, 3, 4, 5, 6.	
	Cromatină	1, 3, 5.	
	Nucleol	1, 3, 5.	

Codificarea cauzelor :

1. Mediul pe care se face recoltarea (utilizat necorespunzător).
2. Timp prelungit de recoltare.
3. Fixare insuficientă.
4. Fixare brutală.
5. Deshidratare insuficientă.
6. Deshidratare brutală.
7. Uscare incorectă.
8. Metalizare cu exces de carbon.
9. Metalizare cu exces de metal.
10. Apropiere prea mare a preparatului față de zona de evaporare.

4.2.1. Fixarea

Absolut obligatorie pentru conservarea rapidă a materialului proaspăt recoltat. Substanțele folosite în fixare sînt : aldehida formică și aldehida glutarică. Mai des utilizată este aldehida glutarică în concentrația comercială de 25%.

Pentru fixarea preparatului concentrația este variabilă în funcție de țesut, celulă sau organ : 1—2,5% pentru celule, 3—10% pentru țesuturi sau organe. Procesul chimic al fixării constă în reacția grupă-

Scanned with OKEN Scanner

rilor de hidrogen active din preparatul biologic cu grupările amino și oxidrilice ale substanței fixatoare, stabilindu-se legături încrucișate și punți chimice ce stabilizează structura celulară.

Ca timp, fixarea este variabilă, atît în funcție de celulă sau porțiuni de țesut cît și de diluția fixatorului cu care se lucrează. Pentru celule, durata este între 1/2—1 oră la un pH 7,3—7,4 la rece (2) (15), iar pentru țesuturi 24—48 ore, la un pH de 7,4 la rece.

Aldehidele : formică și glutarică, se folosesc preparate în diluție, cu ajutorul soluției tampon fosfat Sörensen la pH 7,4—0,1 M. Pregătite proaspăt se pot păstra circa 3 săptămîni la rece.

Pentru diluție, soluția tampon Sörensen se pregătește astfel :

— *Soluția 1* — obținută din fosfat monopotasic (K H_2PO_4) 13,6 g dizolvat într-un litru de apă distilată.

— *Soluția 2* este obținută din fosfat acid disodic (Na_2HPO_4) 14 g dizolvat într-un litru de apă distilată.

Amestecul celor două soluții se face în funcție de concentrația și pH-ul dorit. Pentru utilizare, prezentăm în tabelul nr. 2 diferite concentrații de aldehidă glutarică (25%).

Tabel nr. 2

Concentrații uzuale de aldehidă glutarică (%)

Concentrația de aldehidă glutarică dorită (%)	Aldehidă glutarică comercială (25%) în ml	Soluție tampon Sörensen în ml	Raport aldehidă glutarică/ soluție tampon
1	4	96	1 : 24
2	8	92	1 : 11,3
3	12	88	1 : 7,3
4	16	84	1 : 5,2
5	20	80	1 : 4
6	24	76	1 : 3,1

Menționăm în mod special că aldehidele folosite trebuie să fie foarte pure, în cazul că nu sînt, se purifică prin filtrare, în coloană de cărbune activ.

În afară de soluția tampon Sörensen se utilizează și soluția tampon obișnuită din cacodilat de sodiu 0,1 M la pH 7,6 care se prepară din 16 g de substanță la 1 litru de apă tripludistilată (dacă este hidrată, cantitatea se mărește la 21,4 g).

După fixare, celulele sau țesutul respectiv se spală timp de 10 minute în tampon la un pH de 7,19 pentru soluția Sörensen și un pH de 7,32 pentru soluția cacodilat de sodiu. Uneori soluția tampon este amestecată și cu mediul artificial Eagle sau T199 pentru o prezervare cît mai bună a țesuturilor sau celulelor, pentru examinare.

Scanned with OKEN Scanner

4.2.2. Postfixarea

Se execută imediat după spălare în soluţie de tetraoxid de osmiu (OsO_4), permanganat de potasiu ($Mn_2O_7K_2$) sau crom osmiu.

4.2.2.1. Postfixarea în tetraoxid de osmiu

Tetraoxidul de osmiu, sub formă de cristale (foarte toxic), este dizolvat în soluţia tampon Sörensen, S-collidin sau de acetat veronal la o concentraţie de 2% şi maturat în timp, circa 2 săptămîni, în sticle de culoare brună, ermetic închise; se păstrează în acest mod ca soluţie Stoc.

Soluţia tampon acetat — veronal ca şi S-collidin pentru diluarea tetraoxidului de osmiu 2%, se prepară în modul următor:

— veronal sodic sau dietilbarbiturat de sodiu (barbiturat de sodiu) 14,714 g şi acetat de sodiu (cu trei molecule apă) 9,714 g. Fiecare dintre aceste substanţe se dizolvă în 500 ml apă deionizată, după care se amestecă şi se păstrează ca soluţie Stoc. Din acest amestec se iau 5 ml peste care se adaugă 5 ml acid clorhidric 0,1 M şi 2,5 ml apă tripludistilată, totul la un pH de 7,4.

Soluţia Stoc este stabilită şi poate fi folosită timp de o lună, dacă este ţinută la rece.

— pentru tamponul S-collidin — se iau 2,67 ml de substanţă care se dizolvă în 50 ml apă distilată, apoi se adaugă 4 ml acid clorhidric 1 N completîndu-se pînă la 100 ml cu apă bidistilată.

Tetraoxidul de osmiu este folosit în diluţia de 1%, obţinută din amestecul în părţi egale a acetatului veronal sau S-collidinul cu soluţia Stoc de osmiu 2% la un pH 7,4. Această soluţie se poate păstra la frigider timp de 3 luni. Schema diluţiilor pentru tetraoxid de osmiu în acetat veronal este redată în tabelul nr. 3.

Tabel nr. 3

Concentraţii uzuale de tetraoxid de osmiu

Concentraţie pentru postfixare (%)	Soluţie Stoc osmiu (ml)	Soluţie tampon acetat veronal (ml)	Raport osmiu-tampon
0,5	12,5	87,5	1 : 7
1	25	75	1 : 3
2	50	50	1 : 1
3	75	25	3 : 1

Din punct de vedere chimic, rolul osmiului este de a se fixa pe lipidele şi polipeptidele nesaturate din materialul biologic care trebuie examinat. Concentraţia şi durata lui de acţiune asupra celulelor sau ţe-

Scanned with OKEN Scanner

suturilor sînt diferite. Pentru a examina celulele din organele hematoformatoare şi sînge concentraţia necesară (optimă) este de 0,5% indicat fiind să acţioneze asupra preparatului timp de o oră (după Bessis) sau, dacă este la concentraţia de 1%, timp de 30 minute (reţetă proprie). Nu am observat efect negativ, de alterare a preparatului prin creşterea concentraţiei de osmiu.

Pentru examinarea unor porţiuni de ţesuturi, concentraţia soluţiei de osmiu este de 1% timp de două ore. Postfixarea se poate face atît la rece, cît şi la temperatura camerei, întrucît osmiul penetrează destul de încet materialul biologic.

4.2.2.2. **Postfixarea în permanganat de potasiu**

Mai puţin folosit, dar în încercările noastre s-au obţinut rezultate satisfăcătoare.

Pentru acest tip de postfixare se pregăteşte o soluţie de permanganat de potasiu 1,2% în apă bidistilată. Soluţia 1,2% permanganat de potasiu astfel obţinută se amestecă cu soluţia Stoc de acetat veronal (vezi 4.2.2.1.) la un pH de 7,4 în părţi egale (după Luft.).

Celulele se postfixează în acest amestec timp de o oră, iar ţesuturile 48 de ore, la temperatura camerei sau la rece.

Inconvenientul tehnicii îl constituie însă dificila diferenţiere între sedimentul celular şi soluţia de permanganat de potasiu în etalarea preparatului pe suportul microscopic. Se recomandă în postfixarea porţiunilor de ţesut uşor de identificat.

4.2.2.3. **Postfixarea în crom-osmiu**

Utilizată din anul 1965 (Dalton) soluţia se compune din cromat de potasiu (K_2CrO_7) hidroxid de potasiu, tetraoxid de osmiu şi clorură de sodiu ; amestecul se execută în părţi egale. Este puţin utilizată, nefiind testată de noi.

4.2.3. **Deshidratarea**

Reprezintă operaţia de eliminare a apei din ţesuturi sau celule prelucrate pînă la această fază.

Deshidratarea se poate face în băi de acetonă sau alcool.

Timpul de deshidratare cît şi concentraţia în diversele reţete sînt în general aceleaşi. Succesiunea băilor este următoarea :

— alcool 50%, 70%, 80%, 96%, 100% cîte 10 minute pentru fiecare baie ;

— acetonă 50%, 70%, 80%, 90%, 100% de asemenea cîte 10 minute fiecare baie, cu excepţia celei de 100% unde se păstrează pînă a doua zi. Unii autori (Bessis) recomandă ca după baia de alcool absolut să se execute şi două băi de oxid de propilenă cîte 15 minute. Noi reco-

Scanned with OKEN Scanner

mandăm ca după ultima baie de alcool 100% deshidratura să fie continuată în alcool absolut/Freon 113 în părţi egale timp de 10 minute.

Din experienţă, recomandăm de asemenea folosirea deshidratării în alcool deoarece sedimentul celular sau ţesutul devine mai puţin friabil sau casant aşa cum se prezintă după deshidratarea în acetonă, iar în ceea ce priveşte oxidul de propilenă, acesta nu poate fi utilizat decît în condiţii speciale deoarece poate da intoxicări.

4.2.4. Montarea pe suportul microscopului (holder)

După deshidratare sedimentul sau porţiunea de ţesut urmează a fi montată pe suport (holder).

În cazul sedimentului care se găseşte în ultima baie de alcool, acetonă sau alcool-Freon se recoltează cu ajutorul unei pipete Pasteur şi se etalează uniform prin picături dese cu sediment pe suprafaţa suportului. Pentru porţiuni de ţesut sau conglomerat de celule prinderea pe suport se face cu ajutorul unei paste speciale pe bază de argint, electroconductivă care cuprinde uniform preparatul şi îl fixează puternic de suport.

4.2.5. Uscarea

În introducerea capitolului II am prezentat cîteva metode privind operaţia de uscare, precum şi importanţa ei în evidenţierea celulelor sau ţesuturilor în baleiaj. Uscarea reprezintă o etapă extrem de importantă care a suscitat o serie de controverse, metodele fiind apreciate după calitatea imaginilor obţinute la microscop.

Metodele utilizate de noi au fost : uscarea în aer *(air drying)* şi o variantă proprie de uscare care a dat bune rezultate în cercetările noastre (vid redus).

— Uscarea în aer (air drying) constă în etalarea sedimentului pe suportul microscopic sub formă de picături de Freon 113 sau după tratare cu azot lichid. Acesta, introdus într-un circuit de aer, va duce la evaporarea alcoolului sau acetonei într-un timp foarte scurt. Numai după această operaţie se va executa metalizarea în aparatul de vidare.

— Uscarea (în variantă proprie) se execută după etalarea pe holder a sedimentului sub formă de picături, dar introdusă rapid în aparatul de executare a vidului ceea ce permite uscarea ca atare în vid redus, într-un timp extrem de scurt.

— Celelalte două metode, uscarea prin îngheţare *(freeze-drying)* şi uscarea în punct critic *(critical point drying)* necesitînd o aparatură specială prezentarea metodelor respective nu se va face în această lucrare.

În urma rezultatelor obţinute de noi, putem afirma că prima metodă, cea a uscării în aer (modificată) se poate aplica cu succes pentru evidenţierea ţesuturilor şi celulelor la cabaline, porcine, ovine şi iepure, iar varianta uscării în vid preliminar pentru bovine, păsări şi om.

Scanned with OKEN Scanner

4.2.6. Metalizarea

Reprezintă operaţia finală în pregătirea materialului biologic pentru examinat care se execută într-o instalaţie de producere a vidului. Tehnica de pregătire pentru metalizarea propriu-zisă a preparatelor este prezentată la 12.2. Menţionăm că în tehnica noastră de metalizare s-au eliminat fazele de acoperire cu peliculă de carbon, iar metalele utilizate au fost : cromul sau amestecul crom-aur.

Rezultatele obţinute în evidenţierea preparatelor din ţesuturi sau citoarhitecturii de suprafaţă celulară se prezintă tot aşa de bine ca şi în acoperirea dublă sau în utilizarea altor metode.

4.3. Examinări speciale

Examinările speciale se datoresc de fapt atît performanţelor microscopului în baleiaj cît şi tehnicilor de evidenţiere.

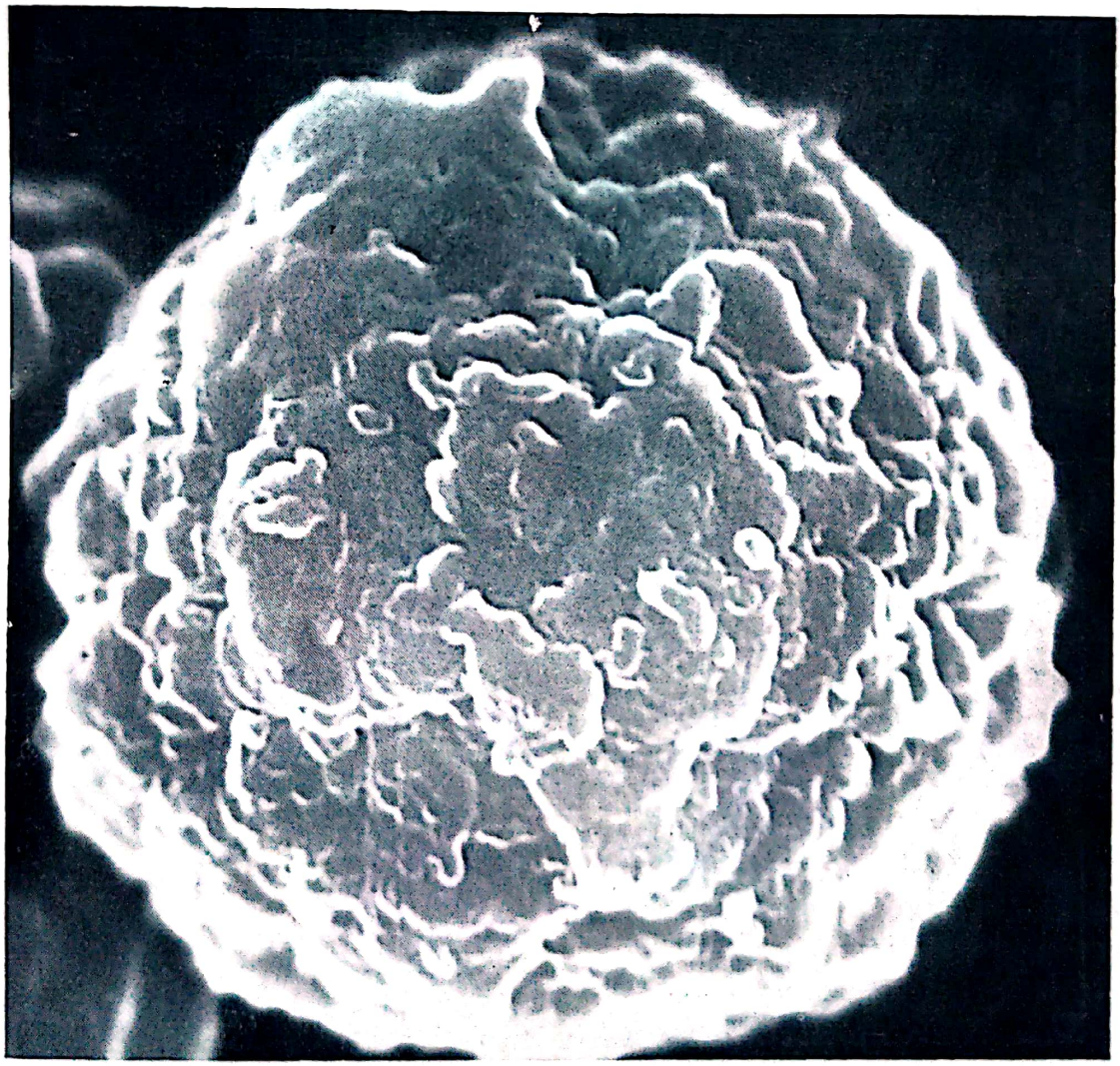


Fig. II/1 x 25 000 Limfoblast tip „B" în leucemia limfoidă acută la om. Contrast normal (D.C.).

Scanned with OKEN Scanner

Obișnuit prezentarea structurii de suprafață pentru celule din anumite organe sau umori este, din punct de vedere tehnic, corect redată. Dar în examinările normale, pe ecranul microscopului cît și în fotografie, o serie întreagă de structuri extrem de fine (care ar permite o interpretare deosebită din punct de vedere ultrastructural) nu apar cu detalii suficient de evidente. Pentru a se pune, totuși, în evidență aceste structuri care — prin detaliile perfect conturate și fine diferențieri — permit observații de o deosebită importanță, am utilizat o anumită modificare posibilă la microscopul JEM 100 C care se poate efectua în sistemul electronic al microscopului. Această modificare permite obținerea unor imagini pe ecran și în fotografii cu contrast înalt (12.1) (fig. II-1 și fig. II-2), (AC). Sistemul electronic la unele microscoape de

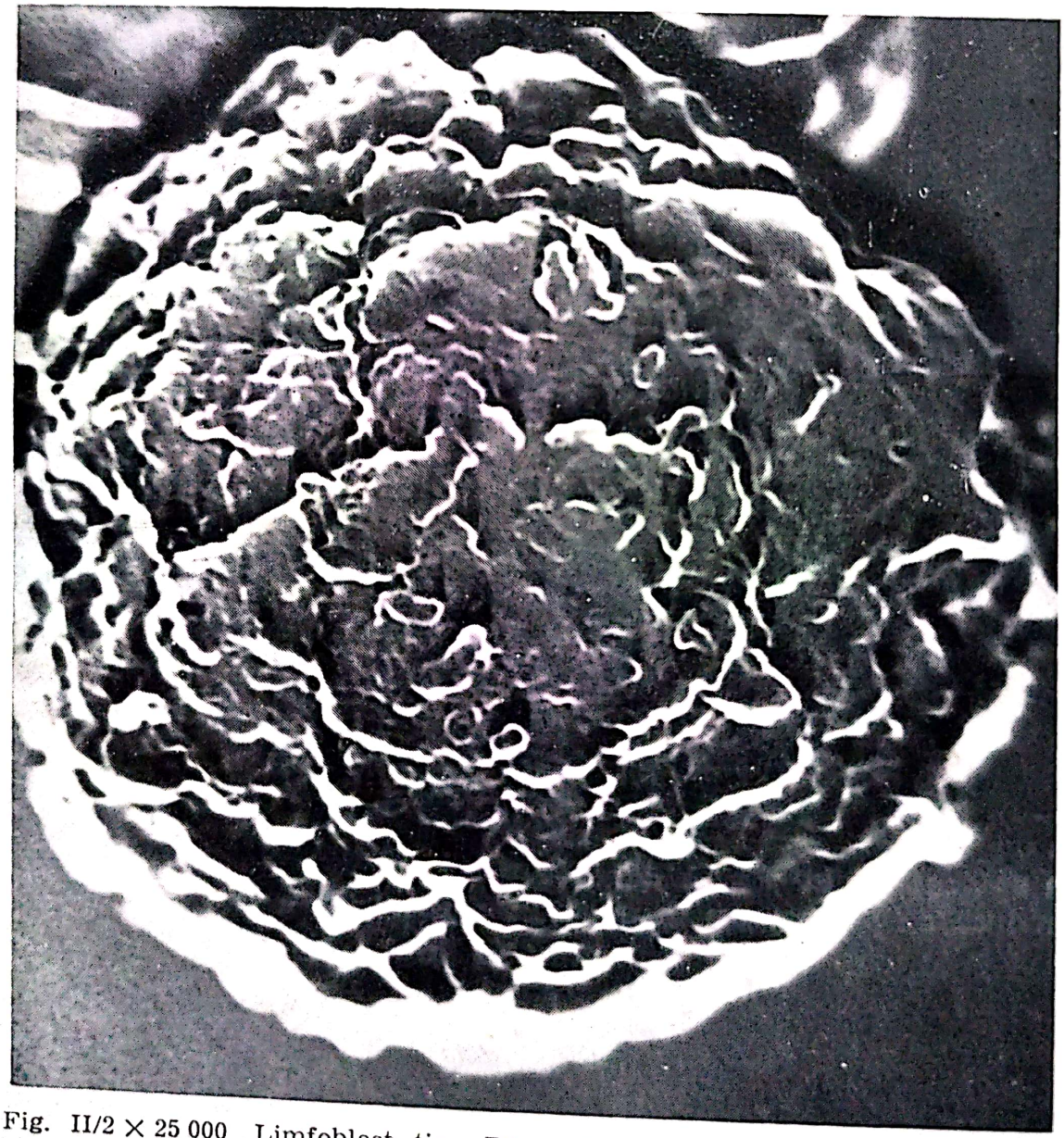


Fig. II/2 × 25 000 Limfoblast tip „B" în leucemia limfoidă acută la om. Contrast înalt (A.C.).

Scanned with OKEN Scanner

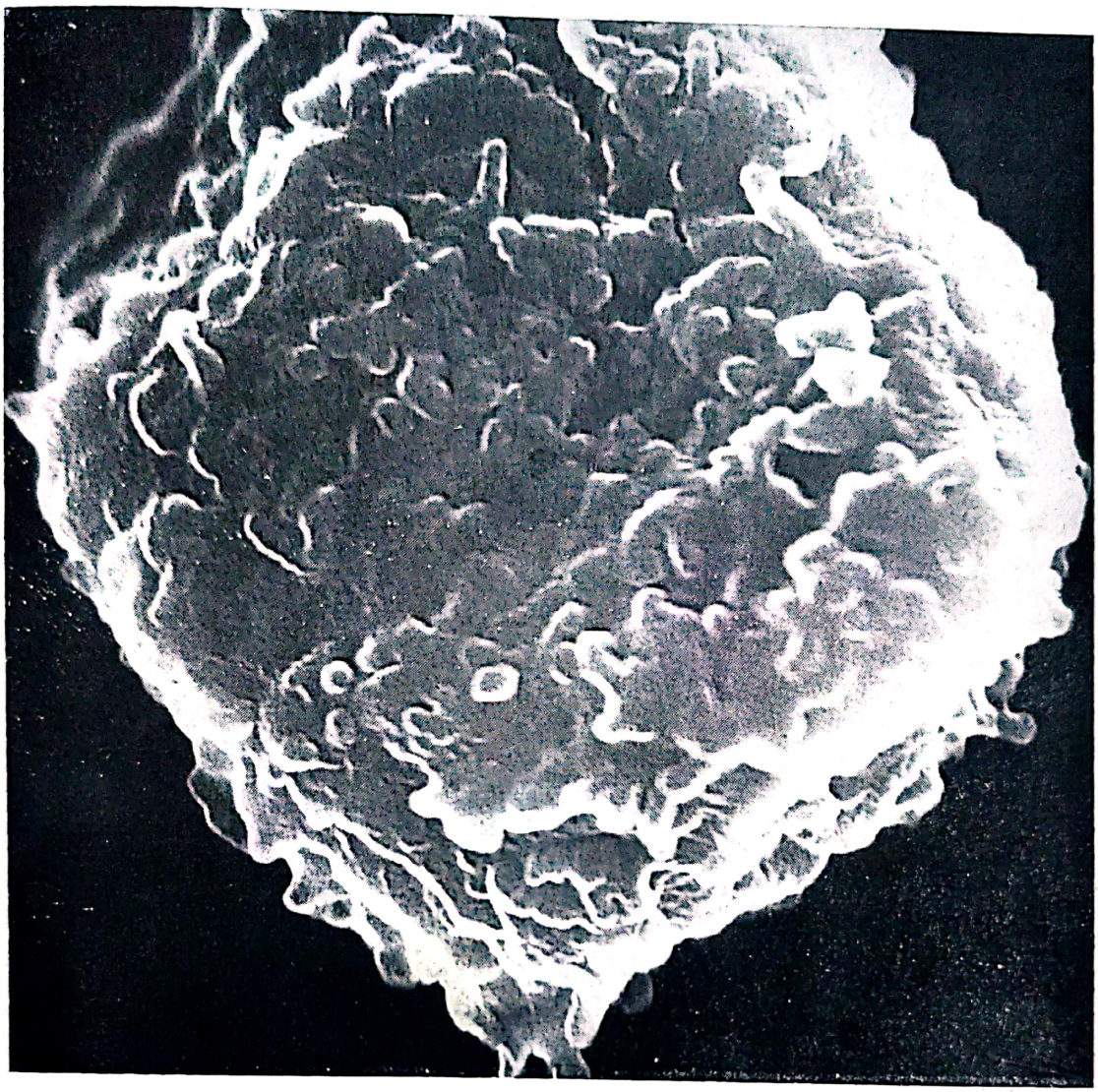


Fig. II/3 × 30 000 Limfoblast tip „B" în leucemia limfoidă acută la om. Goniometru poziția 0° (D.C.).

baleiaj (ex. JEM 100 C) permite evidențierea acelorași imagini atît obișnuit (DC)* cît și în contrast înalt (AC)*.

Altă posibilitate de examinare specială în SEM o constituie utilizarea goniometrului care permite vizualizări ale diferitelor preparate la unghiuri de înclinare diferite. Unele detalii de ultrastructură care nu se evidențiază în poziția normală (0°) pot apare numai prin înclinarea produsă de goniometru în unghiuri mai mici sau mai mari.

Pentru exemplificare prezentăm (în fig. II-3 ; fig. II-4 ; fig. II-5 ; fig. II-6 ; fig. II-7) același preparat vizualizat în diverse unghiuri observîndu-se citoarhitectura de suprafață care la fiecare nouă poziție (unghi) prezintă noi detalii.

D.C. = (în engl.) direct curent.
A.C. = (în engl.) alternativ curent.

Scanned with OKEN Scanner

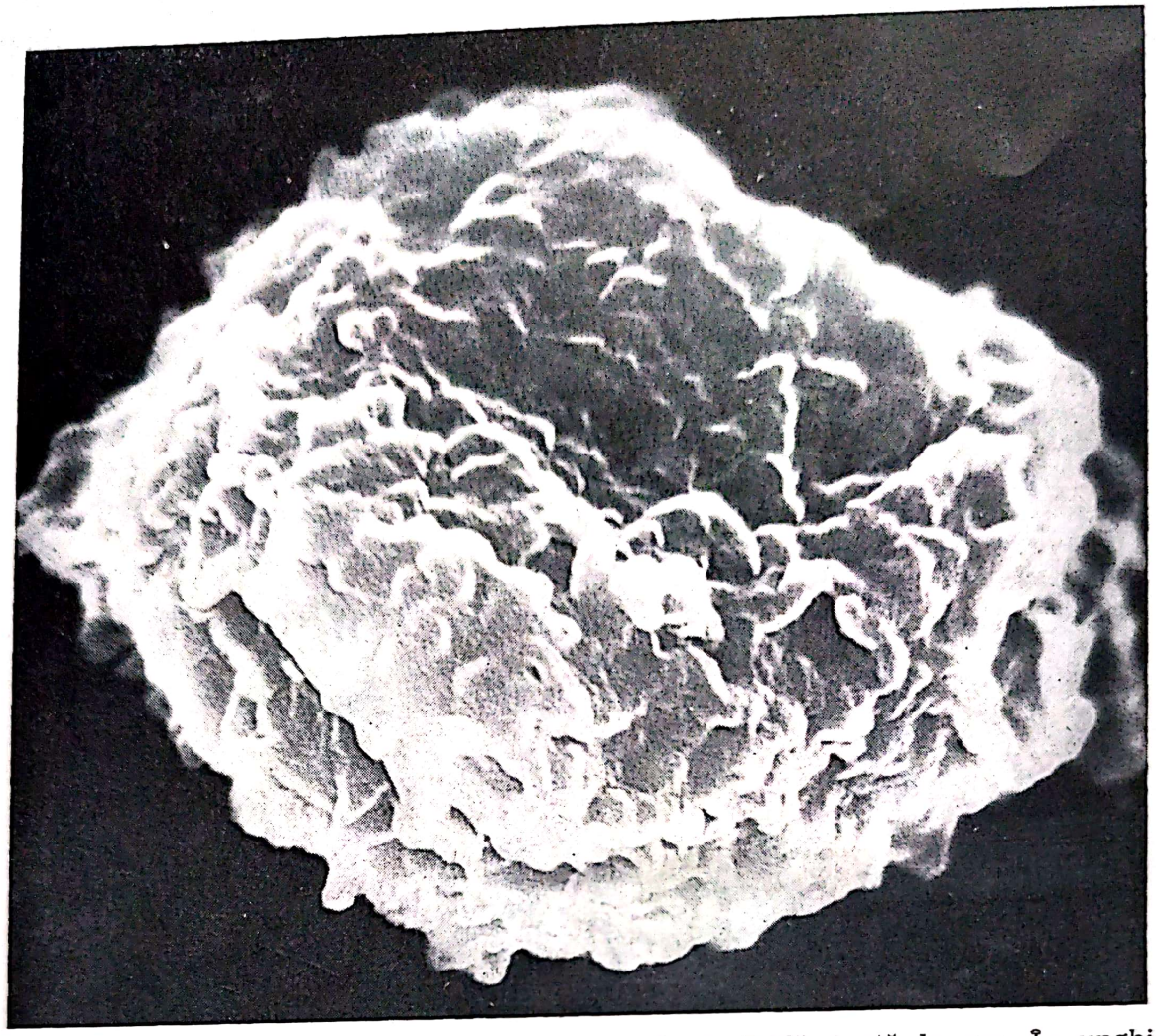


Fig. II/4 x 30 000 Limfoblast tip „B" în leucemia limfoidă acută la om. În unghi de 25° (D.C.).

5. TEHNICI DE PREPARARE RECOMANDATE

Pentru practica curentă, vom prezenta cîteva tehnici dintre cele mai uzuale, privind pregătirea materialului biologic necesar vizualizării în baleiaj. Tehnicile prezentate sînt după metode proprii sau după alți autori, preluate din literatura de specialitate și experimentate.

Tehnica pentru sîngele global, măduvă roșie, extract splenic și ganglionar

Această metodă a fost utilizată de Bessis N. (1972) și este folosită în evidențierea sîngelui global, dar aplicată de noi și pentru celulele din măduvă, splină și ganglioni. Operațiile sînt următoarele :

— recoltarea de material proaspăt ;

— fixarea în aldehidă glutarică soluție 1%, proaspăt dizolvată în mediul Eagle, prin agitare continuă timp de 30 minute (raportul între cantitatea de sînge și fixator trebuie să fie de 20—100 volum fixator la 1 volum material fixat) ;

Scanned with OKEN Scanner

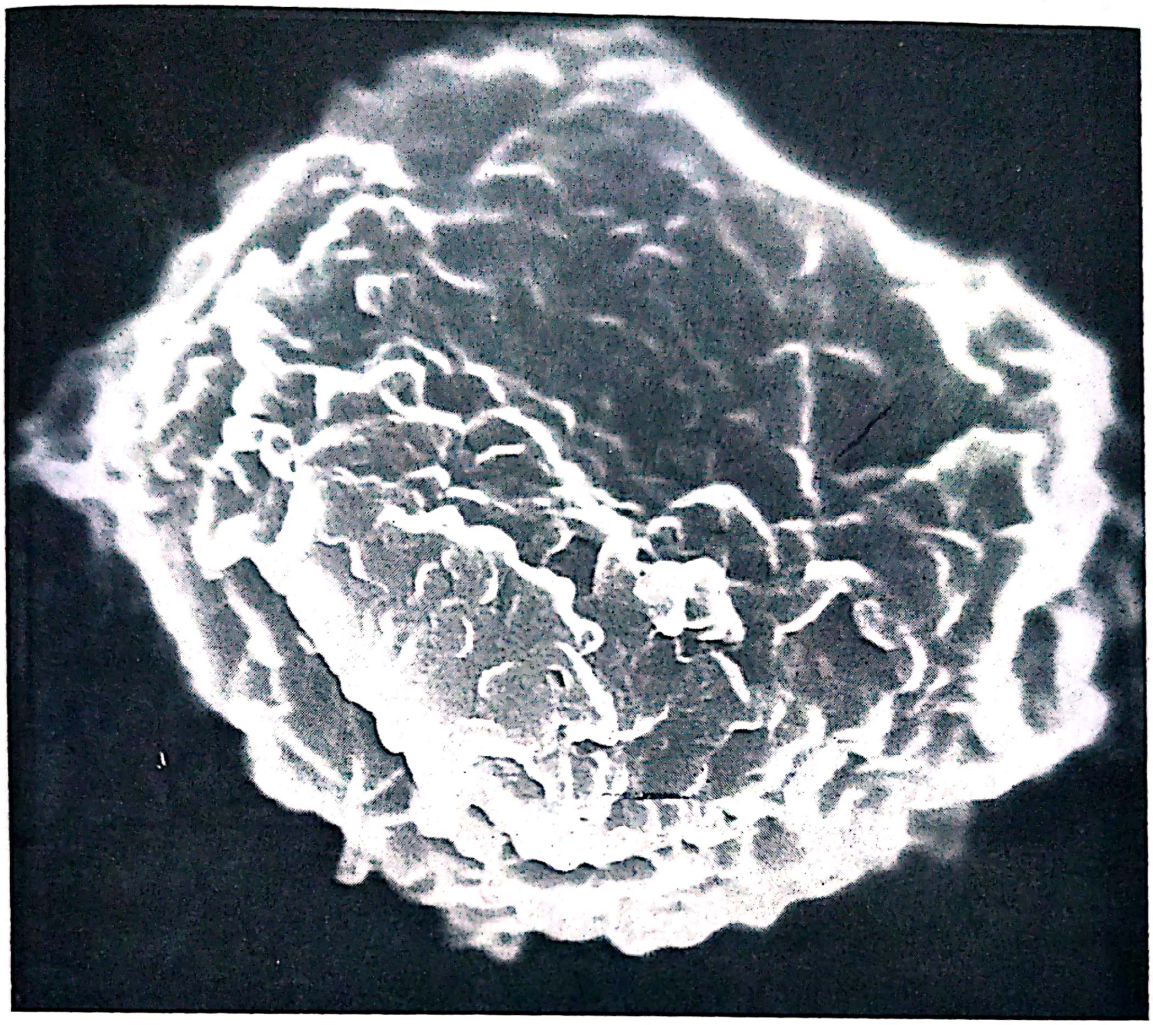


Fig. II/5 x 30 000 Limfoblast tip „B" în leucemia limfoidă acută la om. În unghi de 30° (D.C.).

— centrifugarea sedimentului la 800—1000 turaţii pe minut timp de 5 minute ;

— spălarea sedimentului în mediul Eagle ;

— postfixarea în soluţie de concentraţie 0,5% tetraoxid de osmiu, în mediul Eagle, timp de 60 de minute ;

— deshidratarea în alcool etilic în concentraţie progresivă 50%, 70%, 80%, 96%, 100% cîte 5 minute urmat apoi de o deshidratare în oxid de propilenă timp de 15 minute ;

— uscare realizabilă prin expunere la aer ;

— metalizare într-un vid de 5×10^{-5} torr cu evaporarea amestecului de aur-palladium sub formă de peliculă după care preparatul se poate examina la microscop.

Metoda utilizată de noi în evidenţierea preparatelor la microscopul electronic de baleiaj este următoarea :

— recoltarea materialului cu ajutorul pipetei Pasteur şi picurarea deasupra fixatorului pentru a se forma, în acest mod, un sediment fin şi uniform ;

Scanned with OKEN Scanner

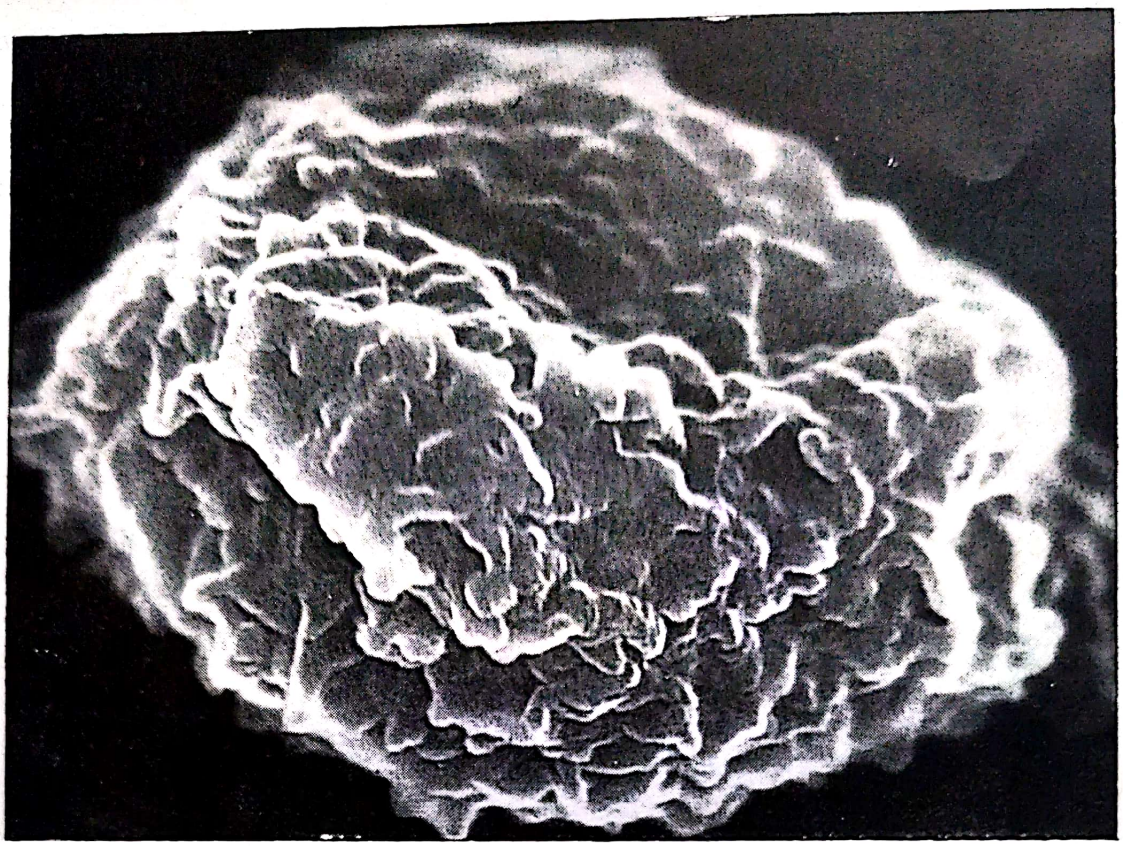


Fig.II/6 × 30 000 Limfoblast tip „B“ în leucemia limfoidă acută la om. În unghi de 45° (D.C.).

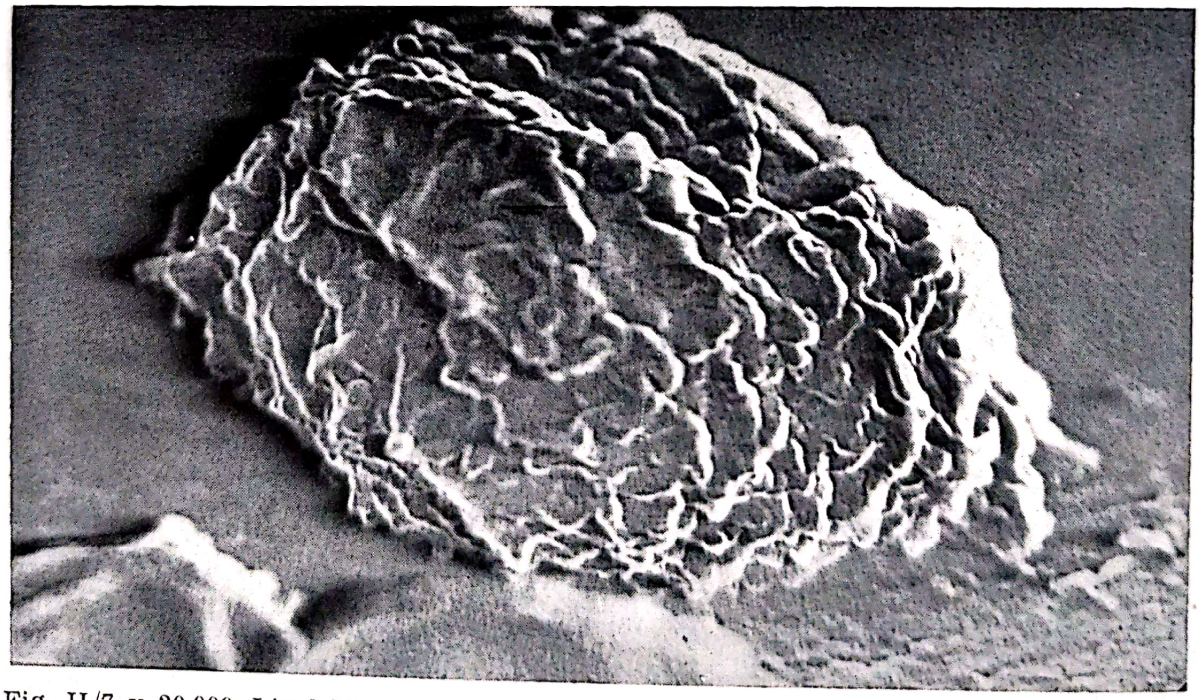


Fig. II/7 x 20 000 Limfoblast tip „B“ în leucemia limfoidă acută la om. În unghi de 60° (A.C.).

Scanned with OKEN Scanner

— fixarea în aldehidă glutarică, soluție 2,5%, timp de 30 de minute, la 4°C ;

— spălare în tampon fosfat (Sörensen), la un pH de 7,2, timp de 10 minute la 4°C ;

— postfixare în soluție 1% tetraoxid de osmiu, timp de 30 de minute, la 4°C ;

— deshidratare în alcool etilic, în concentrații : 50%, 70%, 80%, 96%, 100% (primele două băi timp de 10 minute, celelalte cîte 5 minute, iar materialul este păstrat în ultima baie de alcool pînă a doua zi), apoi se pune într-o baie de acetonă 100% ;

— uscarea se face prin picurarea sedimentului în acetonă pe suportul microscopic etalîndu-se ca un frotiu obișnuit pînă la evaporarea completă a acetonei în vid ;

— metalizarea în vacuum evaporator la un vid de 5×10^{-5} torr prin acoperire cu o peliculă de metal (aur-crom sau crom) prin testarea grosimii peliculei care să nu depășească circa 600 Å (v. 4.2.6) în rotire și la un unghi de 40—60°.

Pentru varianta uscării în vid, după postfixare, băile se fac tot în aceeași concentrație de alcool, dar ultima baie după cea de 100%, este un amestec de Freon 113 — alcool 100% timp de 10 minute sau, înainte în azot lichid. Uscarea se face în vid redus, iar metalizarea ca în prima metodă.

O tehnică specială utilizată de noi pentru o evidențiere a celulelor constă în utilizarea lamelelor de sticlă. Aceasta se execută în felul următor : pe porțiuni mici de lamelă, puse în vase Petri de diametre foarte mici, se picură cîteva picături de material recoltat după care urmează :

— fixarea care se execută prin picurare de aldehidă formică, soluție 1% (2—3 picături), păstrată timp de 20 minute ;

— spălare în soluție Sörensen, la pH 7,2, timp de 5 minute ;

— postfixare în soluție de 1% tetraoxid de osmiu, timp de 15 minute ;

— deshidratare în băi de alcool 50%, 70%, 80%, 96%, 100% urmată de o baie de alcool 100% — Freon 113 timp de 5 minute fiecare ;

— uscare în vid și fixarea pe suport (holder) cu ajutorul pastei electroconductive *(dotite paint)* ;

— metalizare la fel ca și în tehnicile anterioare.

Tehnica pentru obținerea mononuclearelor din concentrat leucocitar

Recoltarea sîngelui se face pe anticoagulant 90 mg (EDTA)K_2 pentru 16 ml sînge prin agitare cîteva minute. Se lasă apoi pentru separarea plasmei circa 1—2 ore la 37°C. Se recoltează plasma și inelul din zona de separare cu ajutorul unei pipete Pasteur sau seringă cu tub. Produsul recoltat va fi centrifugat la 1000 ture/minut timp de 10 minute eliminîndu-se supernatantul.

— Fixarea sedimentului și fragmentarea lui în mici porțiuni se face în aldehidă glutarică 2,5%, timp de 30 minute, la 4°C.

Scanned with OKEN Scanner

— Spălarea se face în tampon Sörensen, la un pH de 7,2, timp de 10 minute, la 4°C.

— Postfixarea se face în soluţie 1% tetraoxid de osmiu, timp de 30 minute, la 4°C.

— Deshidratarea se face în băi succesive de alcool 50%, 70%, 80%, 96%, 100% ; în ultima baie sedimentul se păstrează pînă a doua zi.

— Uscarea se face prin etalarea pe suportul microscopic, picăturile conţinînd sediment, după care se evaporă în vid.

Pentru varianta cu Fluor-carbon (Freon 113) ultima baie este în alcool 100%-Freon 113, timp de 10 minute.

— Metalizarea se face în acelaşi mod ca în tehnicile anterioare.

BIBLIOGRAFIE

1. Anderson D. R., *A method of preparing peripheral leucocytes for electron microscopy*, J. Ultrestr. Res. 13—263, 1965.
2. Bessis M., *Living blood cells and their ultrastructure*, Spring-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973.
3. *Boyde A., Freeze drying in the preparation of animal tissue and cell specimens for scanning electron microscopy ;* publicat în caietele tehnice ale firmei Edwards Nr. Pl/1, 1972, Londra.
4. Boyde A., Wood C., *Preparation of animal tissues for surface scanning electron microscopy*, J. Microscopy 90 (221—249), 1969.
5. Ciocnitu V., *Caracteristicile ultrastructurale ale unor celule normale din organele hematoformatoare şi sînge la pasăre, în S.E.M.* Al V-lea Simpozion Naţional de Microscopie electronică. Bucureşti, 1978.
6. Cohen A. L. ; Marlow D. P., Garner G. E., *A rapid critical point method using fluorocarbons (Freons) and intermediate and transitional fluids... J. Microscopy*, 7, 331, 1968.
7. Hearle J. W. S., Sparrow J. T., Cross P. M., *The use of the scanning electron microscope*, Pergamon Press, Oxford, 1972.
8. Koehler J. K. Hayes T. L., *Advanced techniques in biological electron microscopy*, Edited by James K. Koehler Springer-Verlag, Berlin, New York, Oxford, 1973.
9. Manolescu N., *Citomorfologia măduvei hematoformatoare şi a leucocitoconcentratului la animale*, Editura Ceres, Bucureşti, 1976.
10. Manolescu N., Ciocnitu V., Begnescu R., Lungeanu A., *Electron microscopy aspects of the leukocytoconcentrate in bovine leukoise*, IV the National Conference of Hematology, Bucureşti, 1977.
11. Manolescu N., Constantinescu C., Ciocnitu V., Micu D., *Aspects cytomorphologiques du sang induits expérimentalement par inoculation du virus de l'anémie infectieuse des équidés.* Rev. Med. Int. 3/1979.
12. Manolescu N., Ciocnitu V., *Morfostructura exterioară a celulelor normale mononucleare sanguine la bovine, porcine şi cabaline.* Lucr. Anuar. I.C.V.B. „Pasteur" vol. 14, 1978.

Scanned with OKEN Scanner

13. Manolescu N., Barza H., Caprarin A., Sinchievici B., *Ghid de hematologie a animalelor în creştere intensivă.* Editura Ceres, Bucureşti, 1978.
14. Pease D. C., *Histological techniques for electron microscopy,* Academie Press New York and London, 1960.
15. Polliack A., *Normal, transformed and Leukemie leukocytes,* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977.
16. Polliack A., *Surface morphology of leukemic cells : application of scanning electron microscopy to the study of human leukemias,* Israel J. Med. Sci., 11, 1977 (701).
17. Ruzika F., *Elektronenmikroskopische Hämatologie,* Springer Verlag-Nieu, New York, 1976.
18. Threadgold L. T., *The ultrastructure of the animal cell,* Pergamon Press Oxford, 1976.
19. Warfel A. H., Elberg S. S., *Macrophage membranes viewed through a scanning electron microscope,* Science 170, 1970.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL III

TIPIZAREA CELULELOR HEMATOPOETICE NORMALE ÎN BALEIAJ

6. DESCRIEREA COMPARATĂ A LINIILOR CELULARE NORMALE DIFERENȚIABILE ÎN BALEIAJ

Pentru a putea face o tipizare morfologică, cît mai reală, a celulelor hematopoezei este necesar să se facă o coroborare a datelor furnizate de microscopia optică (tehnici clasice de colorare și citochimico-enzimatice) cu cele obținute prin sistemu lSEM (baleiere) la microscopul electronic. Microscopia optică nu poate face diferențierea celulelor din linia limfoidă (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

Considerăm că hematologul, care este în același timp și un morfohematolog, trebuie să posede cunoștințe complexe legate, inclusiv, de morfologia exteriorului celulelor sanguine, fapt care îi va conferi elemente suplimentare, la elaborarea unui diagnostic în cadrul extrem de diversificat și complicat al hemopatiilor sistemice (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22). Hemograma, adenograma, medulograma sau splenograma, interpretate la microscopul electronic SEM aduc argumente suplimentare pentru diferențierea celulelor hematopoezei normale și patologice, menționînd însă necesitatea respectării unei tehnici corecte, care să excludă artefactele.

„Protejarea" suprafețelor celulare ține de durata de lucru, tipul și calitatea substanțelor chimice întrebuințate, de etalonarea specimenului pe holder și de metalizare (5).

Studiind circa 280 cazuri de hemopatii normale și patologice la microscopul electronic în baleiaj (SEM) am putut constata că elementele mononucleare (liniile monocitară și limfocitară) sînt bine individualizate ca morfostructură de exterior și pot fi corect tipizate. În rest morfologia celulară nu este suficient de caracteristică pentru identificare și este necesar un studiu comparat prin microscopia optică și microscopia electronoptică în transmisie (vezi tab. 1, cap. III—IV). Toate datele ce se prezintă mai jos sînt personale și realizate după tehnica descrisă la cap. II.

Scanned with OKEN Scanner

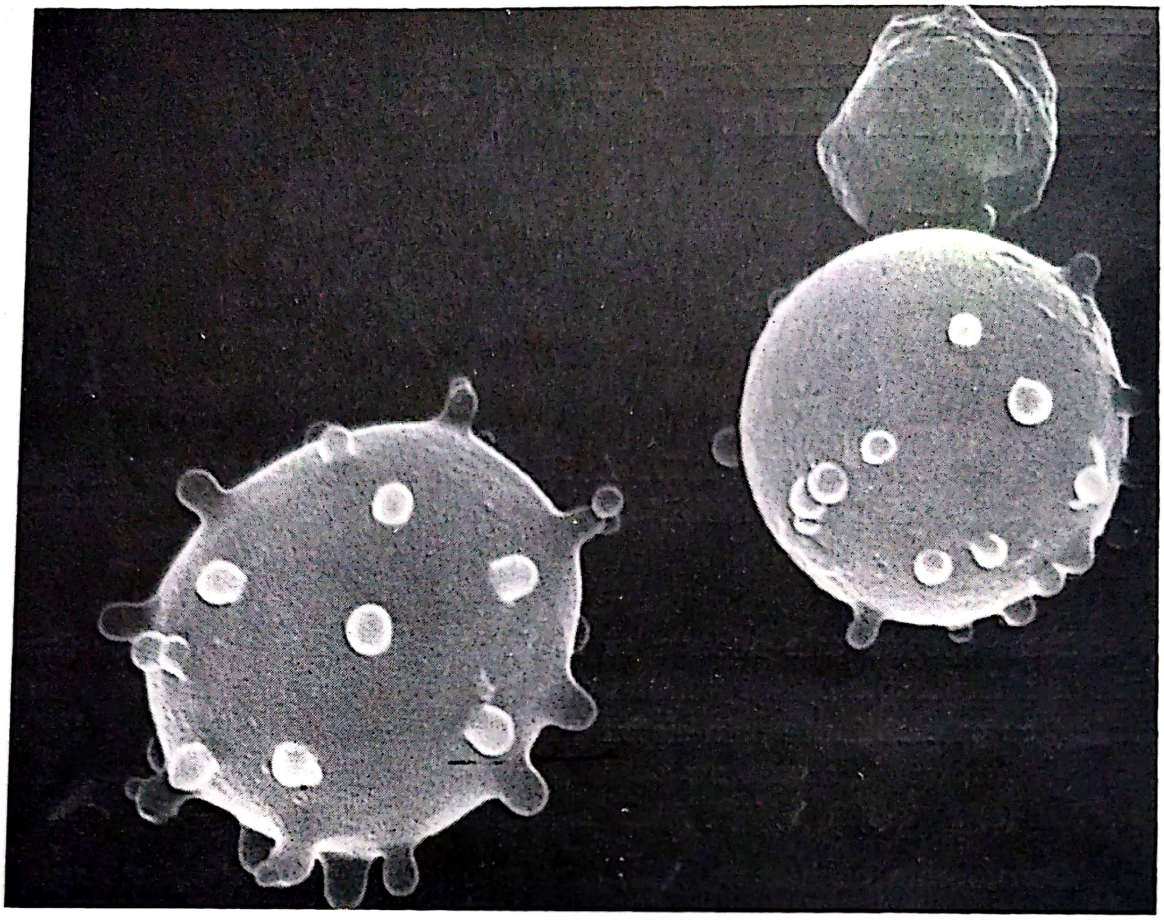


Fig. III-IV/1 x 6 000 Grup de echinocite de oaie (sînge periferic).

6.1. Linia limfoidă

6.1.1. Celulele limfocitare „T"

Acest grup de limfocite este de origine timică, adică timodependente şi asigură atît memoria imunologică a organismului cît şi răspunsul imun mediat celular. Au o viaţă lungă şi o largă capacitate de diferenţiere în „vivo" în cazuri speciale, cît şi în „vitro" după stimulare cu concanavalină A sau/P.H.A. (phitohemaglutinină M sau P). În aceste condiţiuni prin diferenţiere s-a demonstrat că limfocitele „T" adulte nu sînt elemente finale, ci au un mare potenţial de diferenţiere ca urmare a unor stimuli adecvaţi, de natură imunologică, mitogenă etc. fig. III—IV/1.

6.1.1.1. Limfoblaştii „T"

Limfoblastul „T" reprezintă capul de serie al liniei limfoide, avînd o talie cuprinsă între 20 şi 25 microni. Sînt elemente rotunde, avînd pe suprafaţă *butoni* foarte rari şi puţin exprimaţi, cea mai mare parte a suprafeţei lor fiind netedă sau uşor crenelată. În seria animală (după

Scanned with OKEN Scanner

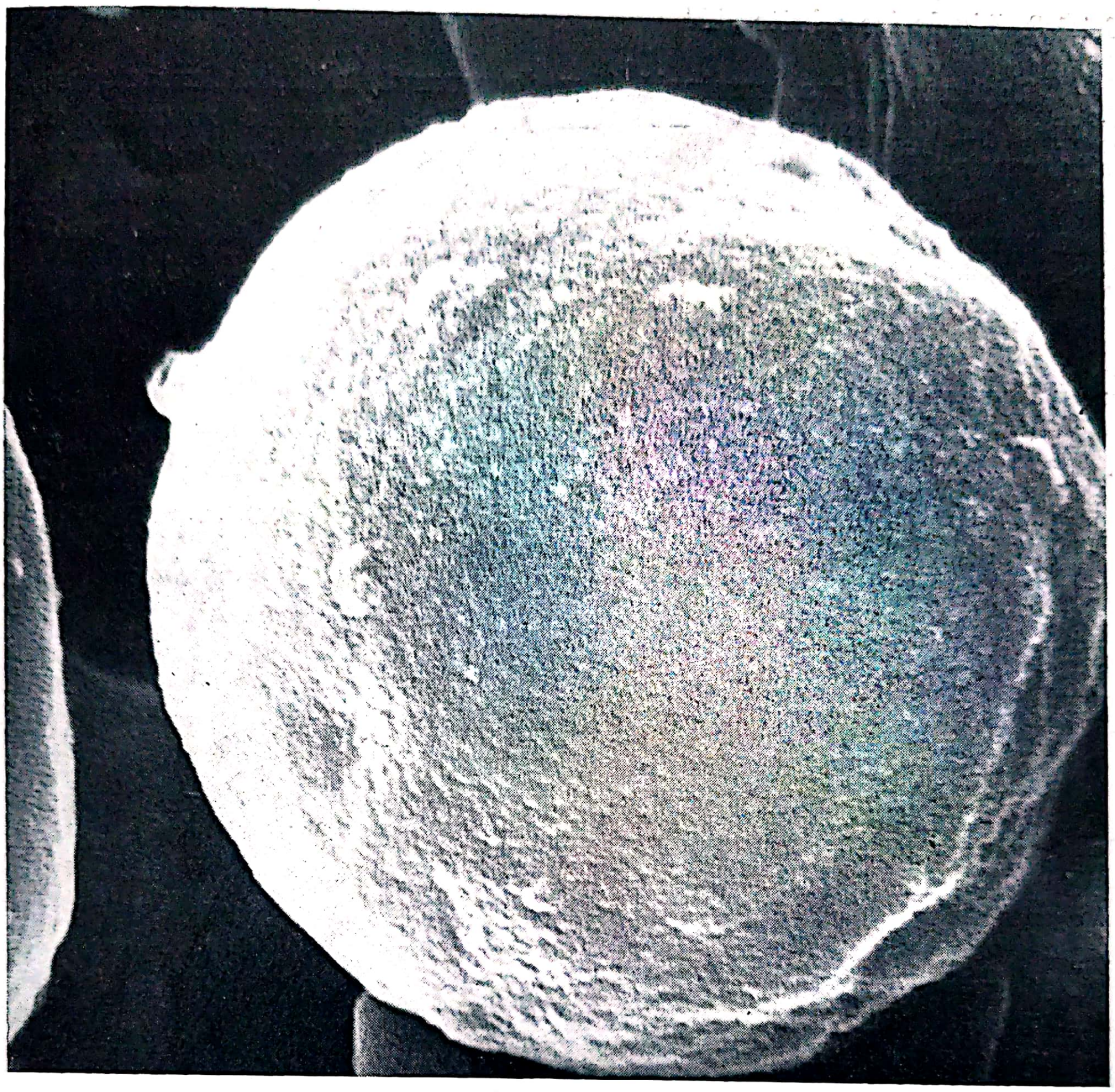


Fig. III-IV/2 x 60 000 Limfoblast de tip „T“ (Leucocitoconcentrat). Sînge de porc normal. Rare denivelări de tip butonat — mai mult cu aspect lins.

cercetările noastre) la nivelul sîngelui periferic, procentul cel mai mare de limfoblaşti „T“ îl posedă păsările, iar cel mai mic omul (1,5 %—0,5%). Fig. III—IV/2.

6.1.1.2. **Prolimfocite „T“**

Sînt elemente de filiaţiune rezultate prin diviziunea limfoblaştilor „T“ şi posedă caractere intermediare între aceştia din urmă şi limfocitele adulte. Au o talie cuprinsă între 15—20 microni, sînt perfect rotunde, iar pe suprafaţa celulară prezintă butoni mai frecvenţi, dar mai mici ca mărime. În seria animală, procentul cel mai mare de prolimfocite „T“ pare a fi tot la păsări (8 %) faţă de om şi cabaline (2%).

Scanned with OKEN Scanner

6.1.1.3. Limfocite adulte „T“

Reprezintă faza terminală (dar de rezervă) a liniei limfocitare „T“ și apar prin maturarea prolimfocitelor. Sînt elemente rotunde, avînd talia cuprinsă între 10—20 microni. Suprafața celulară prezintă un număr mare de butoni de mărimi diferite lăsînd numai mici spații netede. În stare normală aceste elemente predomină numeric în sîngele periferic, într-un raport de 4/1—6/1 cu limfocitele „B“ (fig. III—IV/3).

6.1.2. Celulele limfocitare „B“

Au o frecvență mult mai mică în sîngele periferic decît limfocitele „T“. Sînt timoindependente sau medulodependente. Au o viață scurtă și organizează efectuarea răspunsului imun mediat umoral. Aceste celule

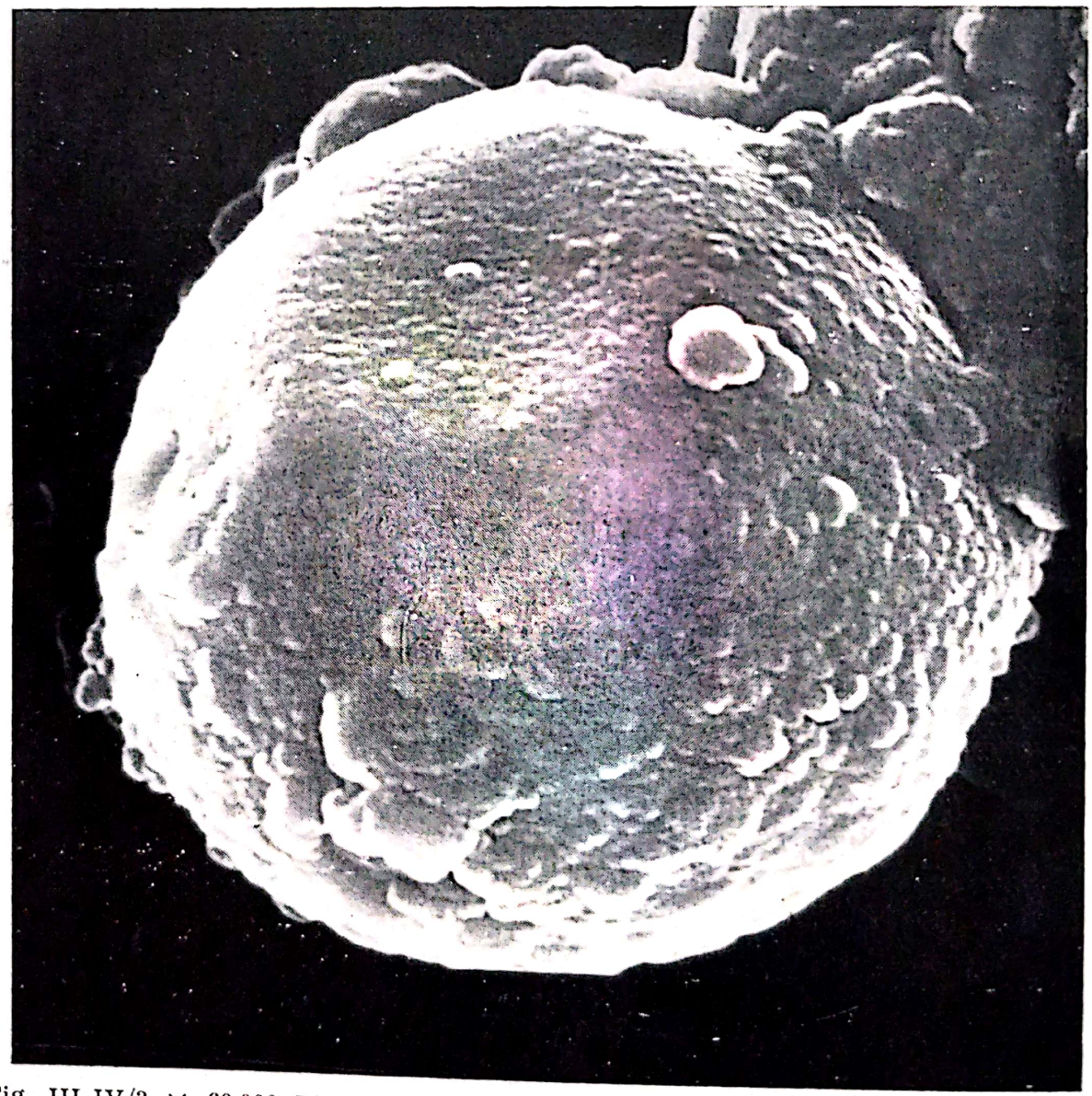


Fig. III-IV/3 × 60 000 Limfocit de tip „T“ (Leucocitoconcentrat). Sînge de bovină normală. Frecvență crescută de butoni de diferite mărimi.

Scanned with OKEN Scanner

asigură totodată comanda inițierii proliferării liniilor celulare de tip plasmocitar, în diferite reacții imunologice. Limfocitele „B" se pot identifica și diferența și optic prin testul de *rozetare* specifică EAC.

6.1.2.1. **Limfoblaștii „B"**

Sînt capii de serie ai grupului de limfocite „B". Apar ca elemente rotunde sau ușor tasate, avînd o mărime de 20—25 microni. Caracteristic pentru aceste celule, din punctul de vedere al citoarhitecturii de exterior, este prezența microvililor scurți, groși și rar dispuși, cu variații relativ mari în funcție de specie și evoluție. De exemplu la cal se observă microvilii cei mai scurți și mai groși, la om și bovine microvilii — cei mai

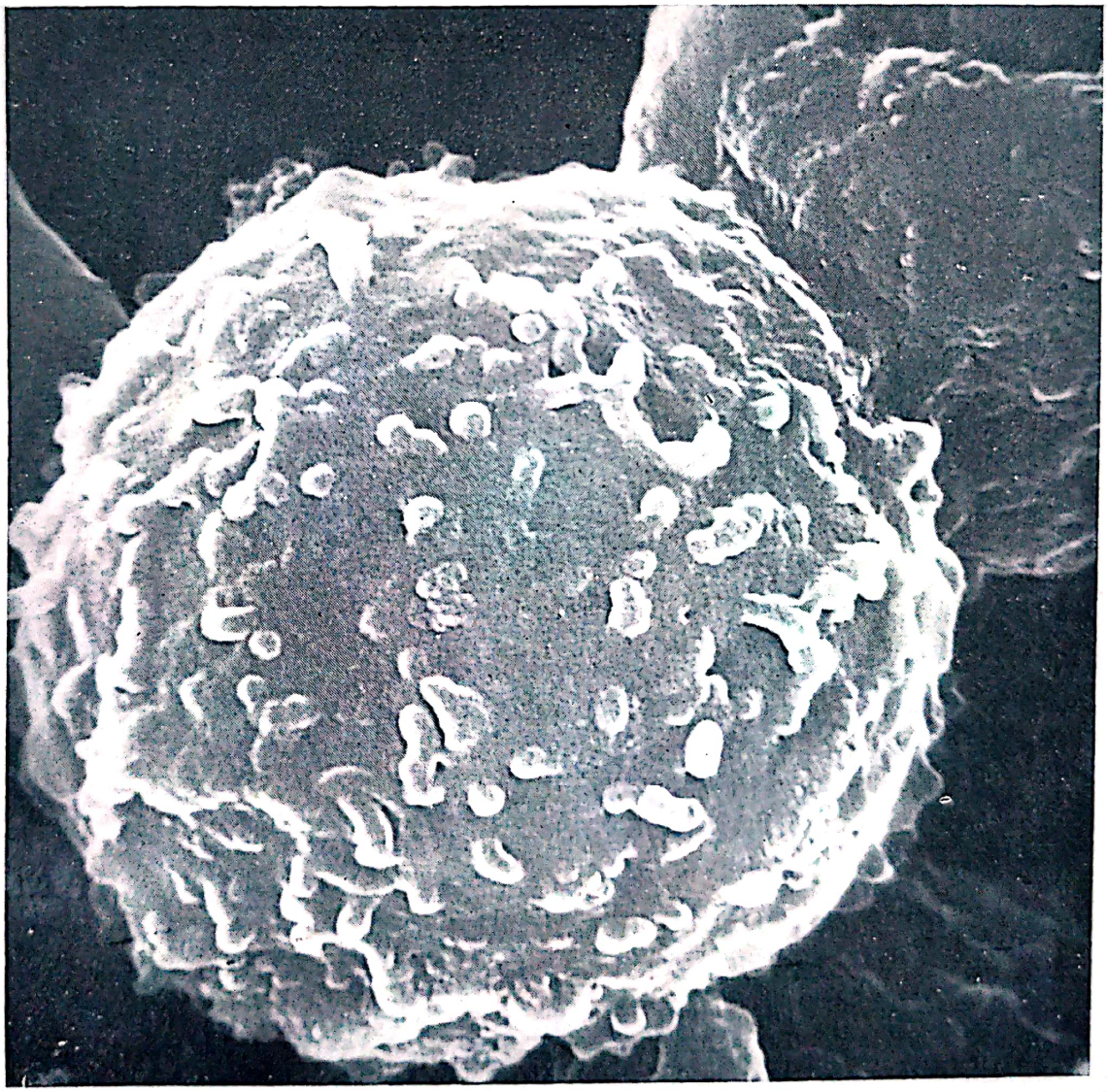


Fig. III-IV/4 x 25 000 Leucocitoconcentrat — cal normal. Limfoblast „B". Se disting formațiuni microviliale relativ groase.

Scanned with OKEN Scanner

scurți și mai deși, iar la porc — o situație intermediară. În seria animală frecvența cea mai mare a limfoblaștilor „B“ există la păsări (0,09%), iar cea mai scăzută, la om (0,02%). Fig. III—IV/4, 5, 6, 7, 8.

6.1.2.2. **Prolimfocite „B“**

Sînt elemente de filiațiune rezultate din diviziunea limfoblaștilor „B“ și posedă caractere intermediare între aceștia și limfocitele adulte. Au o talie cuprinsă între 15—20 microni, sînt perfect rotunde, iar suprafața celulară este în mare parte asemănătoare cu cea a limfoblaștilor „B“. În seria animală frecvența lor cea mai ridicată se întîlnește la cabaline (1,5%), iar cea mai redusă la om (0,7%). Aceste date procentuale au fost comparate și cu rezultatul testului specific de rozetare EAC.

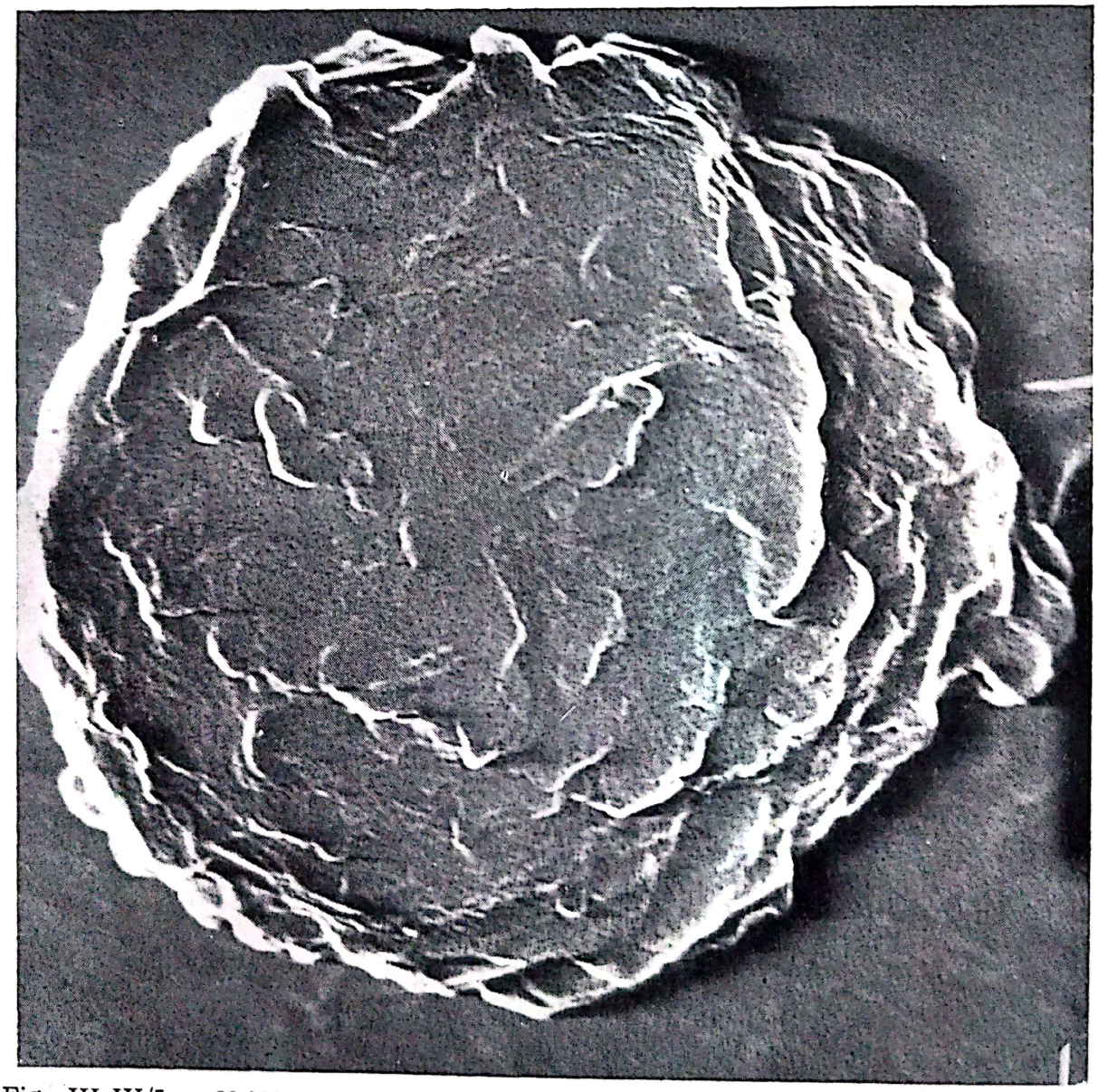


Fig. III-IV/5 x 60 000 Leucocitoconcentrat bovine normal. Tehnica de examinare prin curent alternativ AC. Limfoblast „B“. Formațiunile digitiforme microviliale sînt mult mai fine.

Scanned with OKEN Scanner

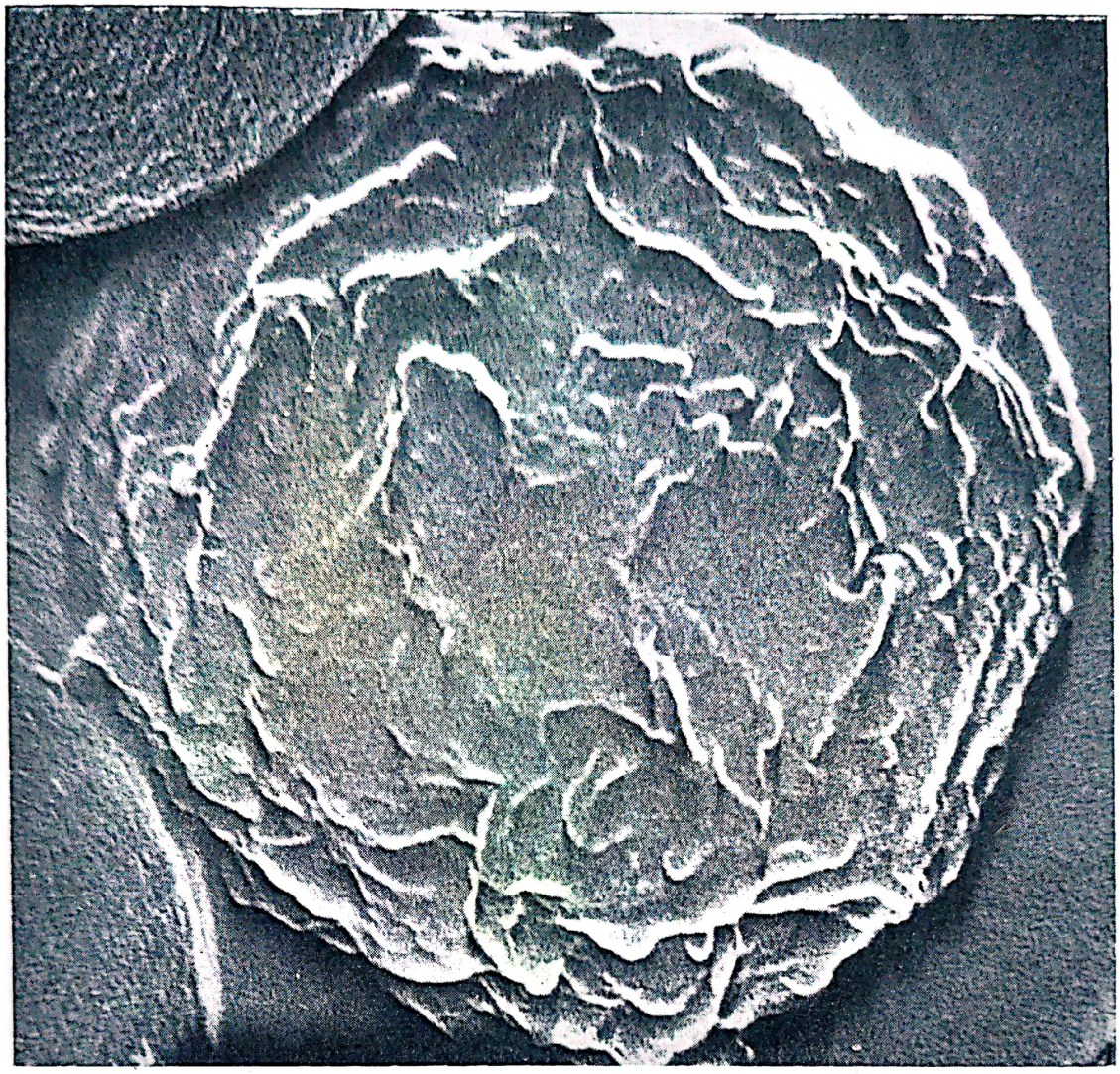


Fig. III-IV/6 × 60 000 Leucocitoconcentrat de porc normal. Tehnica de examinare (A.C.). Limfoblast „B". Formațiunile digitiforme microviliale sînt ca grosime intermediare între cal și bovine.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. III-IV/7 × 15 000 Leucocitoconcentrat de cal. *Limfoblast* „B" același aspect de formațiune digitiforme microviliale grosse.

Scanned with OKEN Scanner

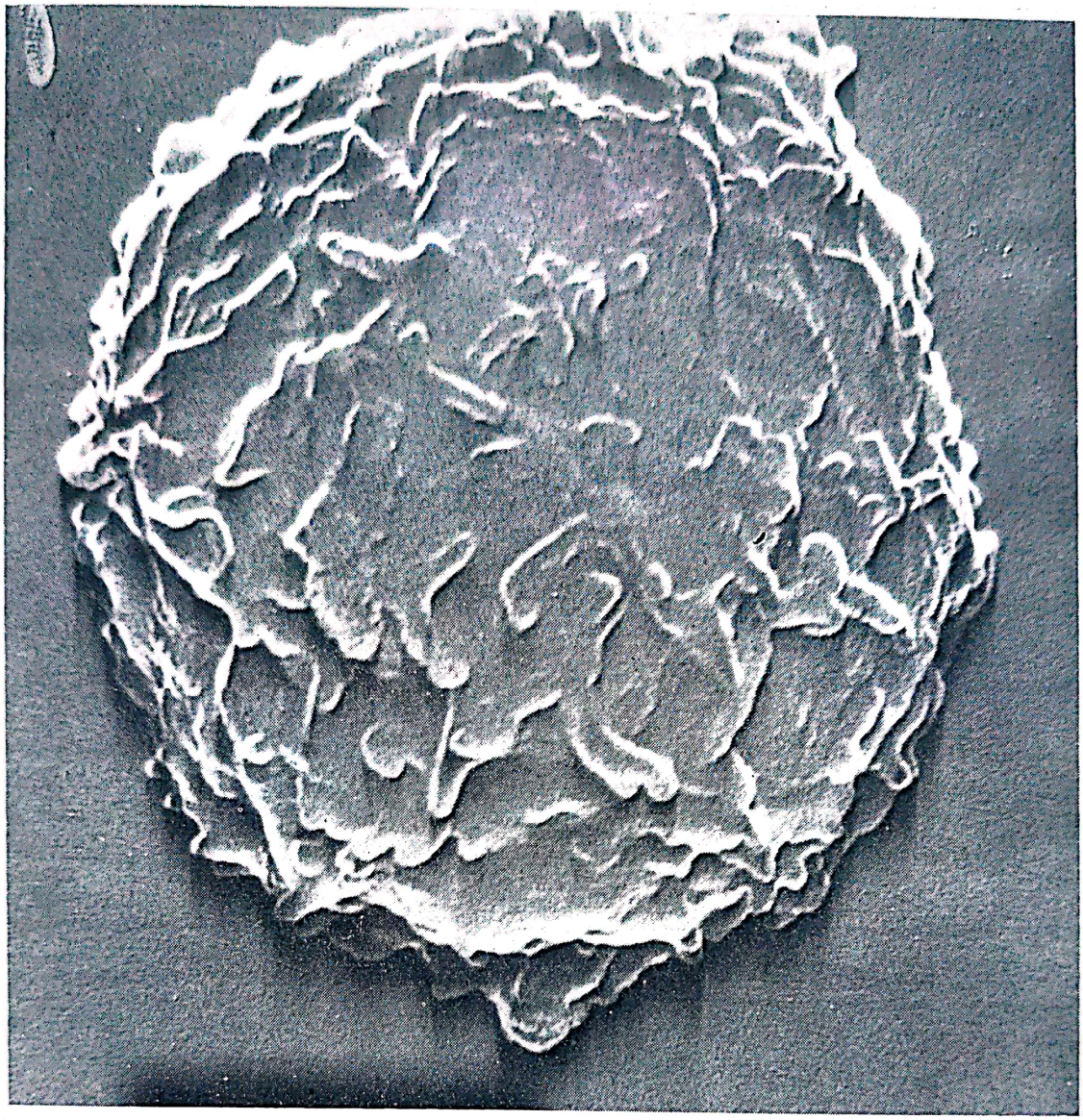


Fig. III-IV/32 x 25 000 Sînge periferic de cal — Mnemie infecţioasă acută. Celulă zenţa în număr mare a microvililor (formaţiuni digitiforme) fine şi mai numeroase. Tehnica de examinare prin A.C.

Scanned with OKEN Scanner

6.1.2.3. **Limfocite adulte „B“**

Sînt rezultatul maturării prolimfocitelor. Sînt stimulate în „vitro“ cu polivinil-pirolidonul pentru efectuarea transformării blastice specifice. Sînt elemente rotunde, cu talia cuprinsă între 10—20 microni. Suprafața celulară (ca o caracteristică majoră) este acoperită de o mare cantitate de microvili relativ fini sau mai groși în funcție de etapa de maturare și de specie. Frecvența acestora în seria animală este mai ridicată la păsări (12,5%) și mai redusă la ovine (7,5%). În cadrul acestor imagini tridimensionale a limfocitelor adulte se înscrie (dar se diferențiază după alte criterii) și limfocitele K (Killer) cît și cele N (Nulle) (fig. III—IV 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

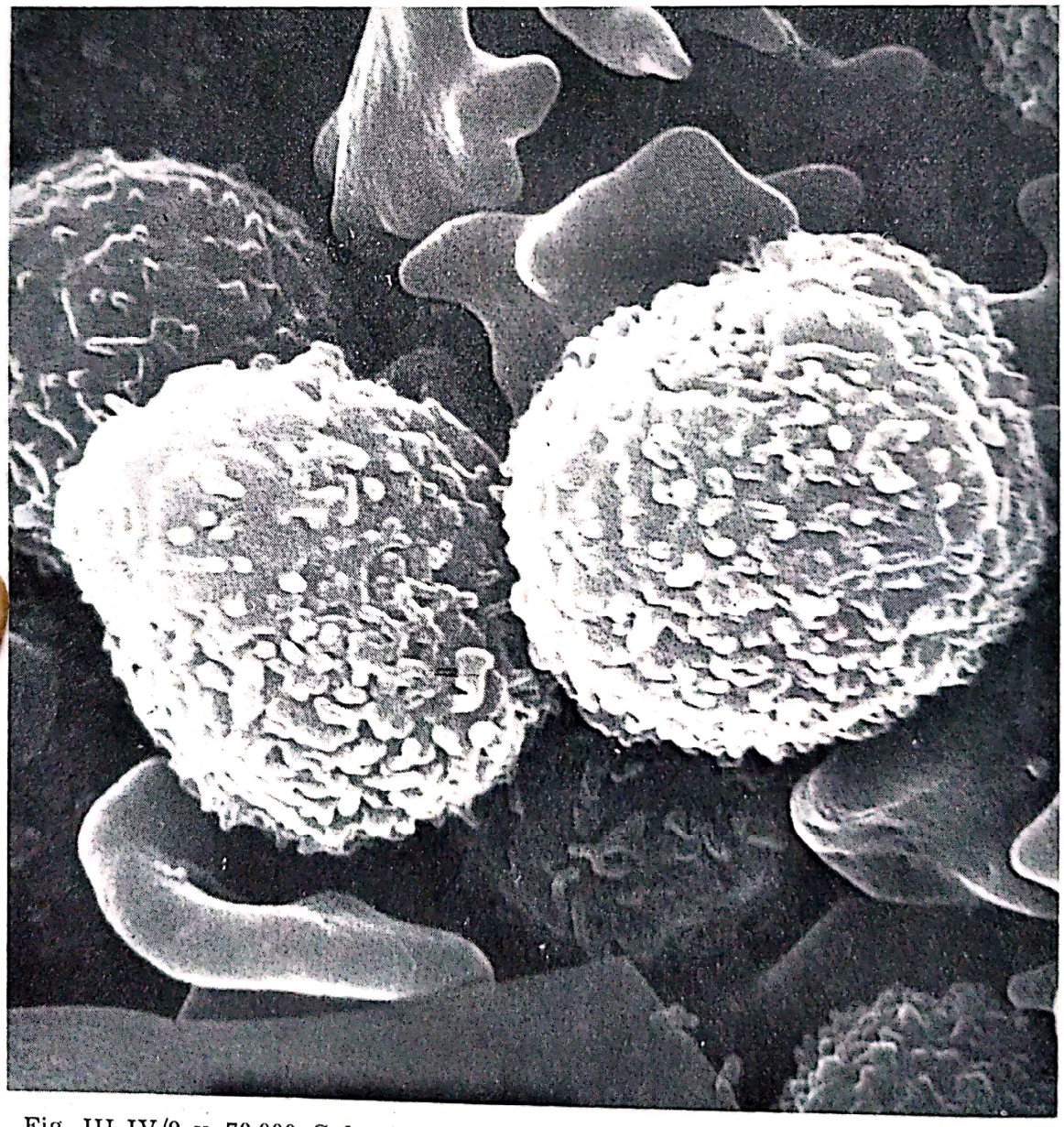


Fig. III-IV/9 x 70 000 Splenogramă normală de porc. Limfocite de tip „B“.

Scanned with OKEN Scanner

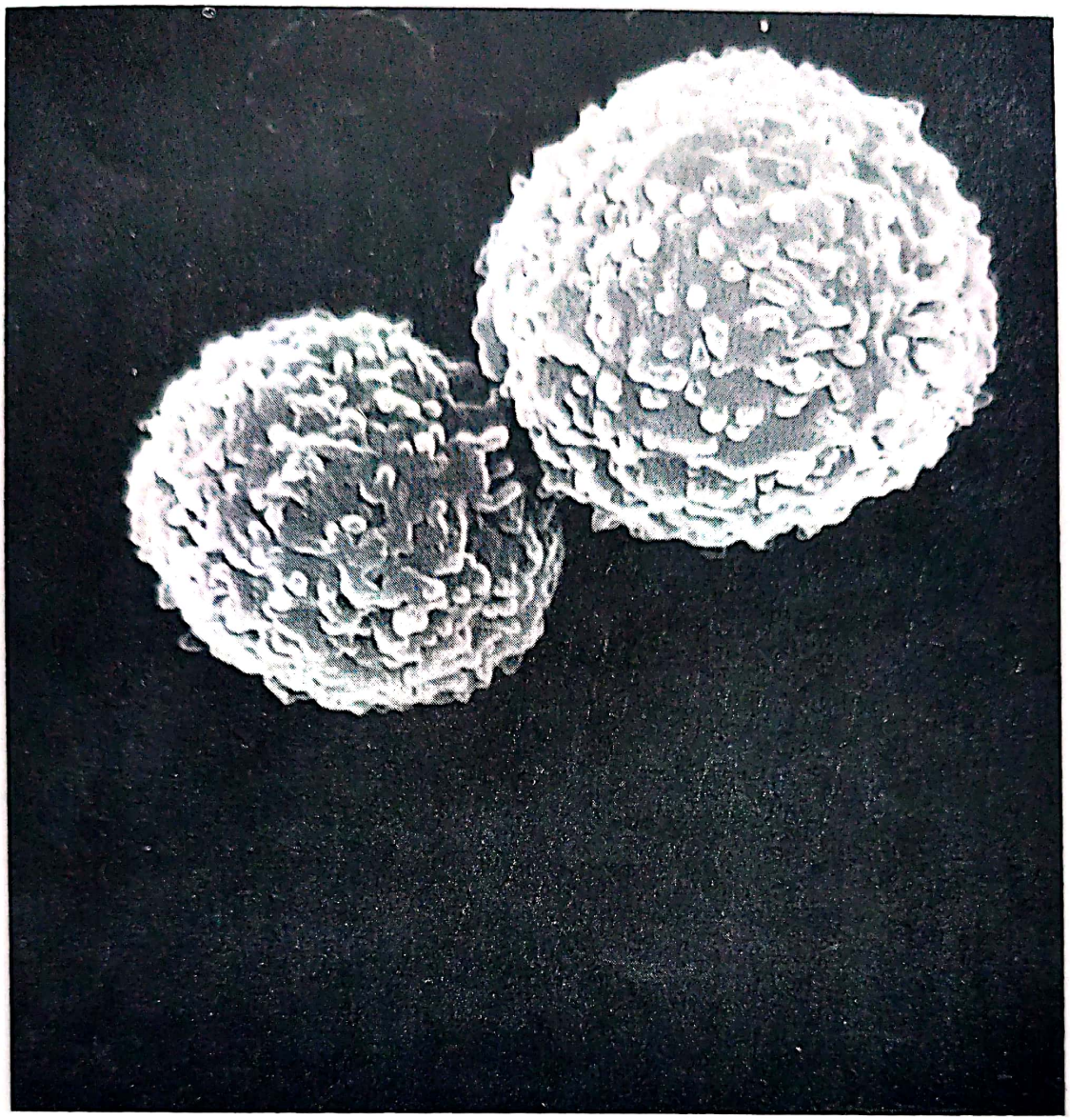


Fig. III-IV/10 x 5 000 Medulogramă normală de porc. Limfocite „B".

Scanned with OKEN Scanner

Fig. III-IV/11 × 30 000 Leucocitoconcentrat om. Hepatită cronică evolutivă. Limfocit „B" — se observă rărirea vililor cît și îngroșarea acestora în mare grad. Tehnica de examinare prin A.C.

Scanned with OKEN Scanner

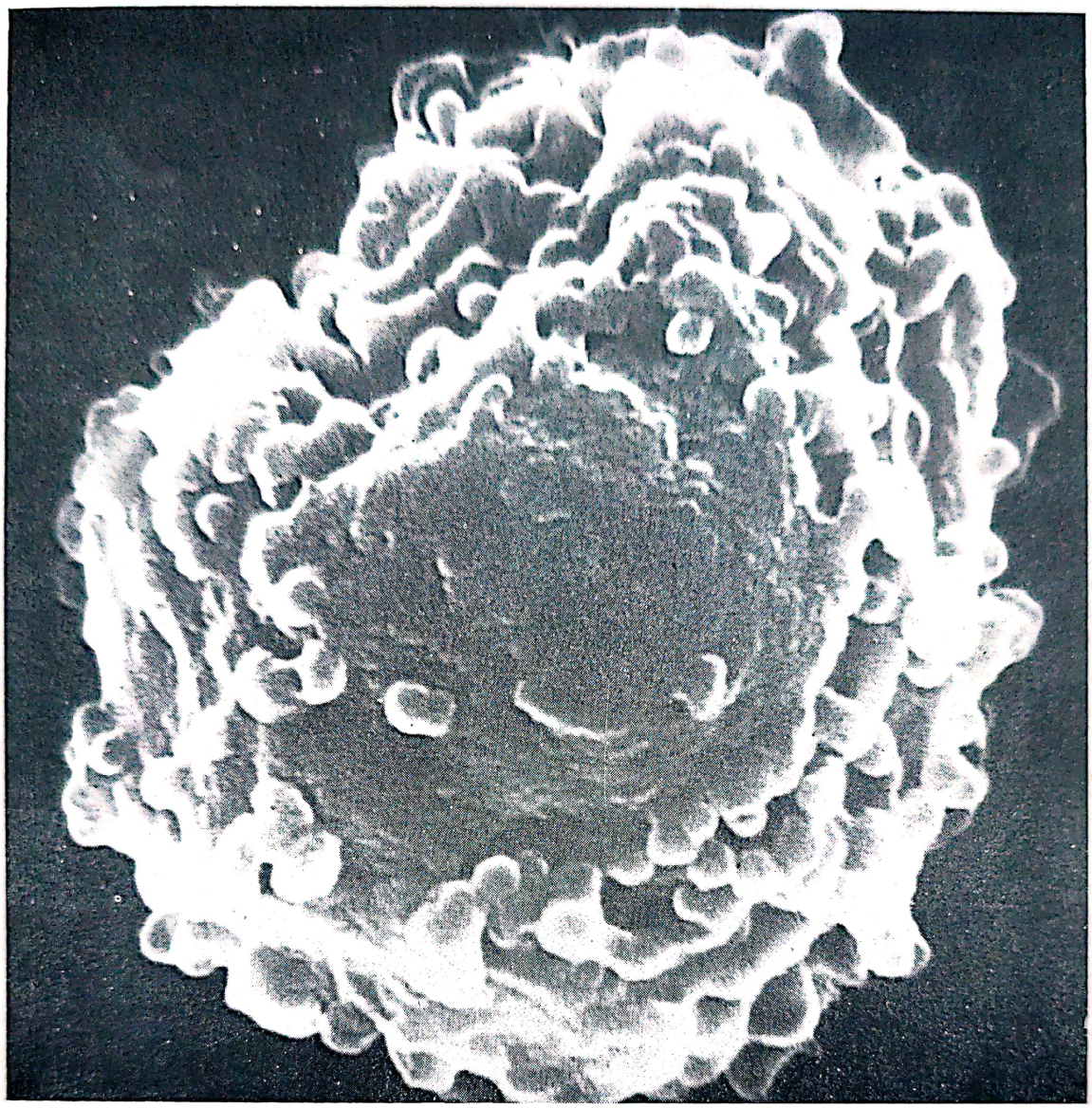


Fig. III-IV/12 x 56 000 Sînge periferic pasăre. Limfocit „B" — cea mai puternică îngroșare a microvililor (formațiuni nete digitiforme).

Scanned with OKEN Scanner

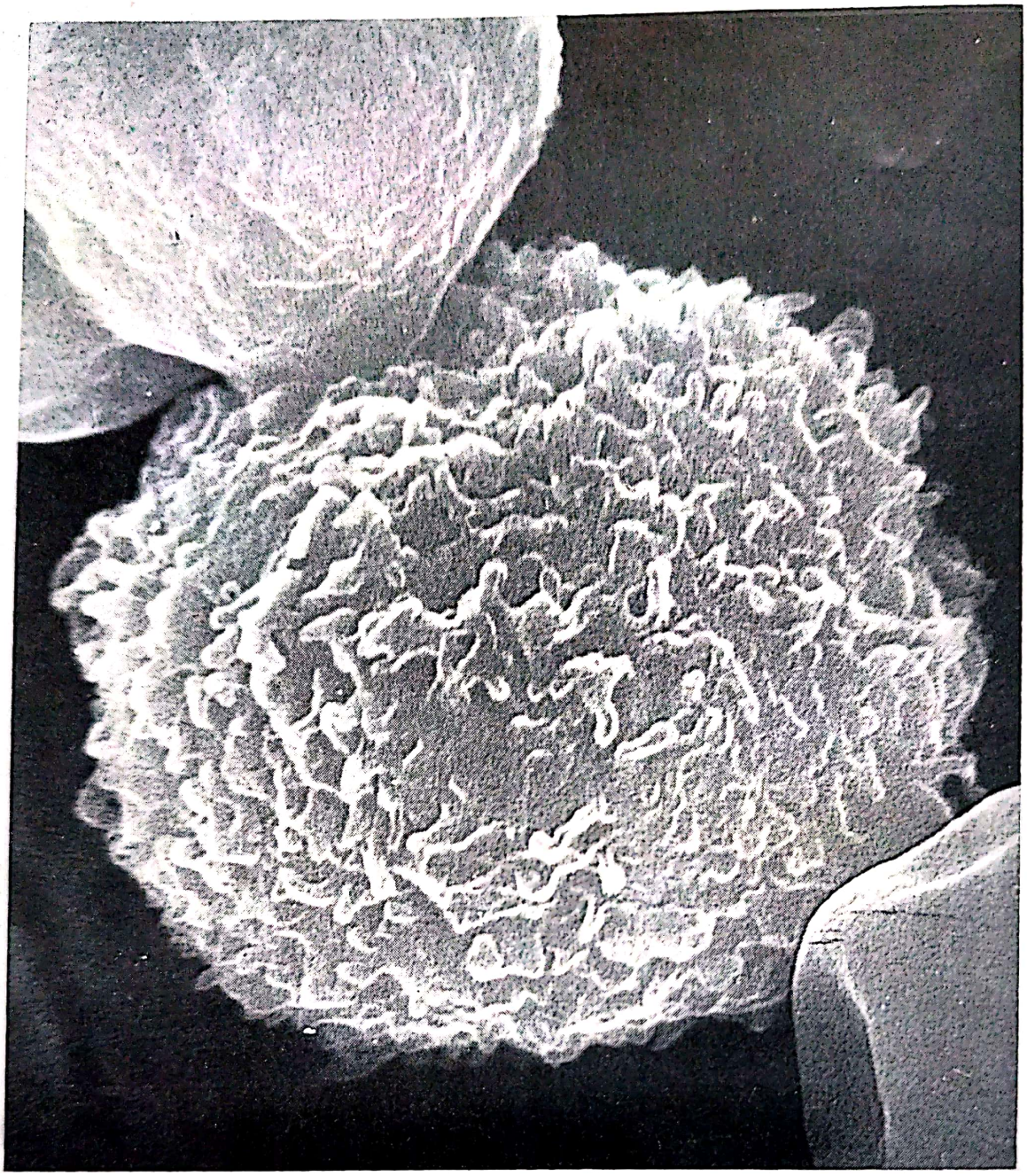


Fig. III-IV/13 × 45 000 Leucocitoconcentrat de cal normal. Limfocit „B“ multiple formaţiuni microviliale subţiri şi uniform răspîndite.

Scanned with OKEN Scanner

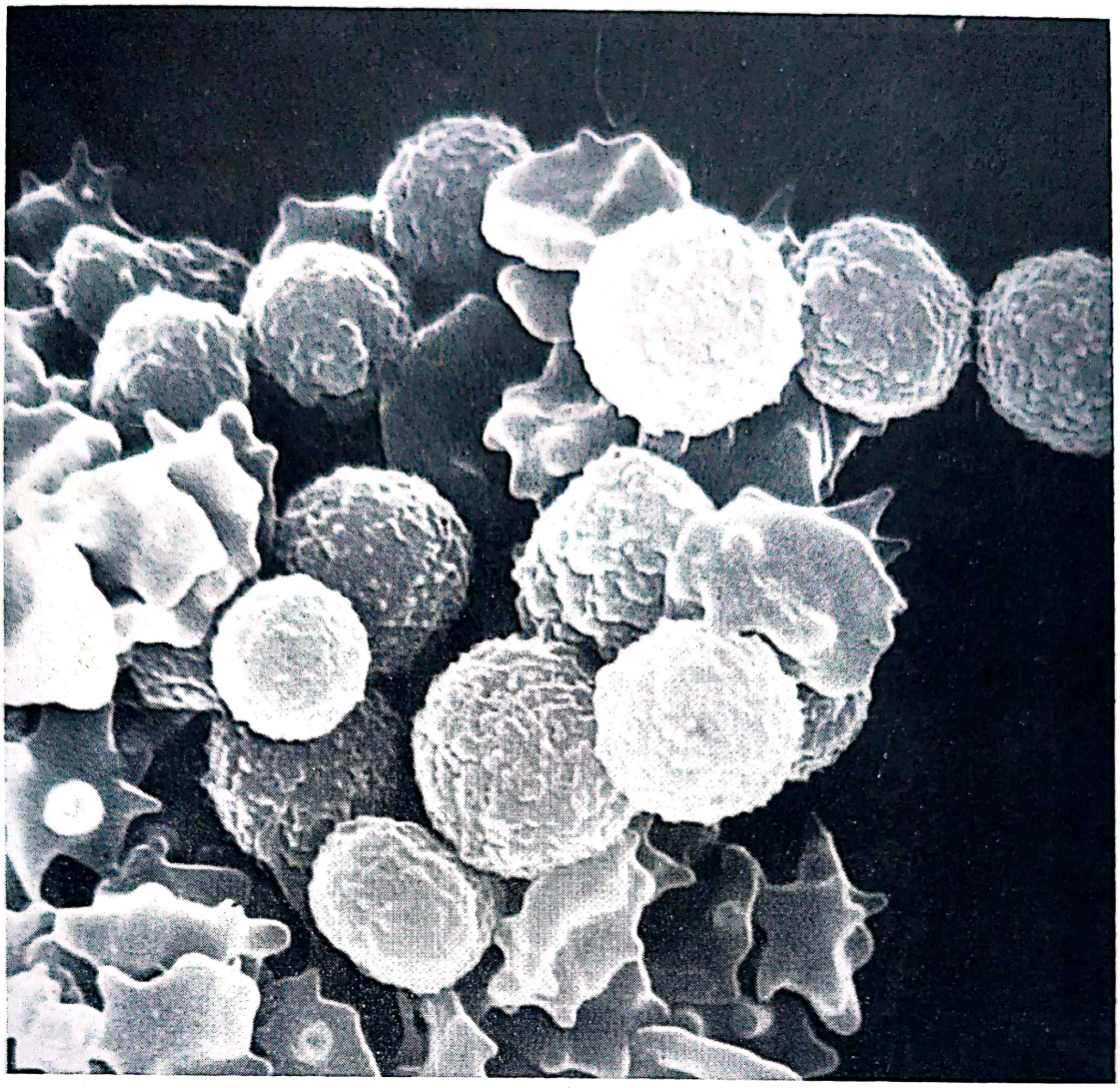


Fig. III-IV/14 × 7 500 Adenogramă de porc. Frecvență mare a limfocitelor de tip „B".

Scanned with OKEN Scanner

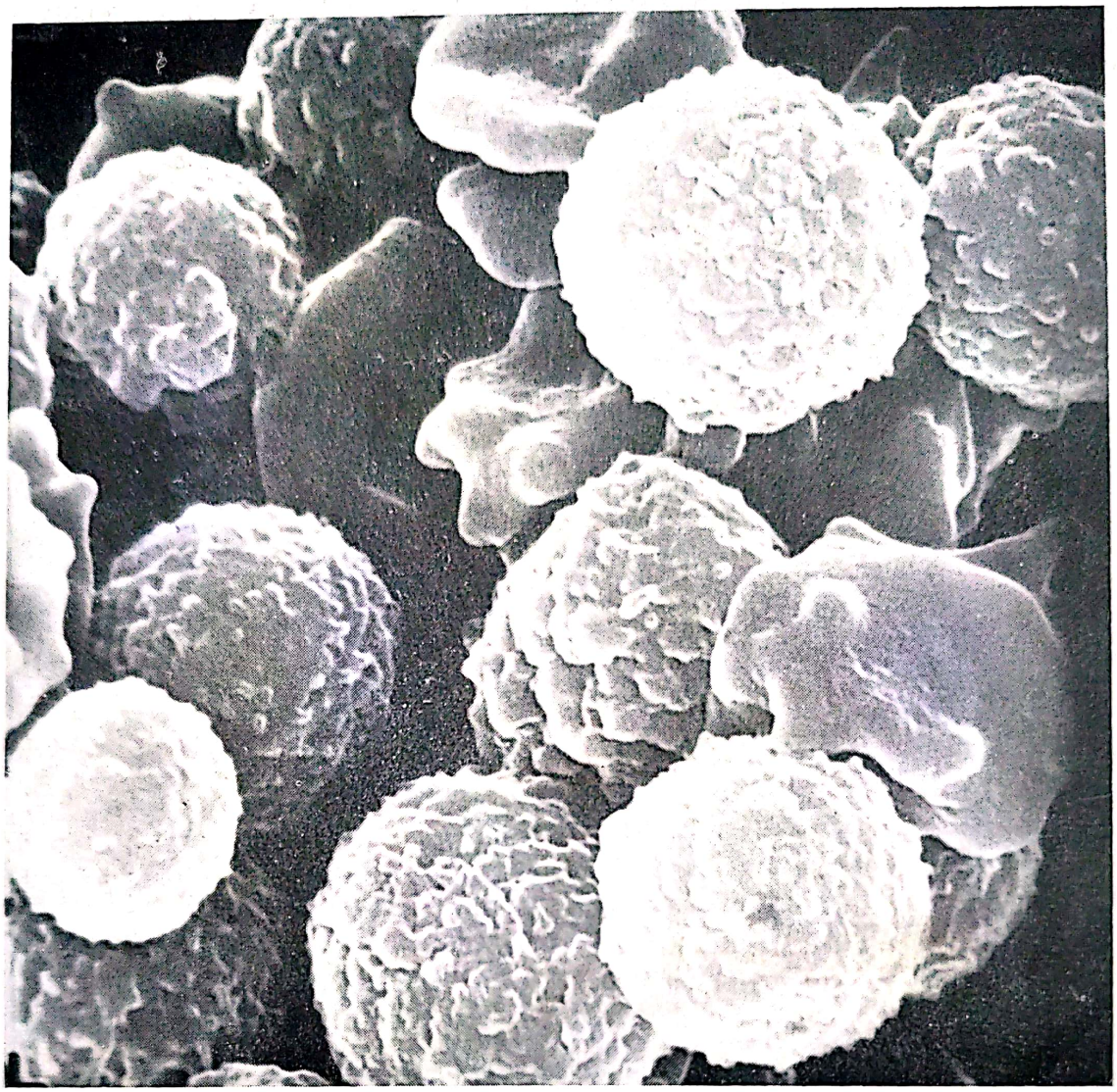


Fig. III-IV/15 x 15 000 Adenogramă de porc — același aspect mărit.

Scanned with OKEN Scanner

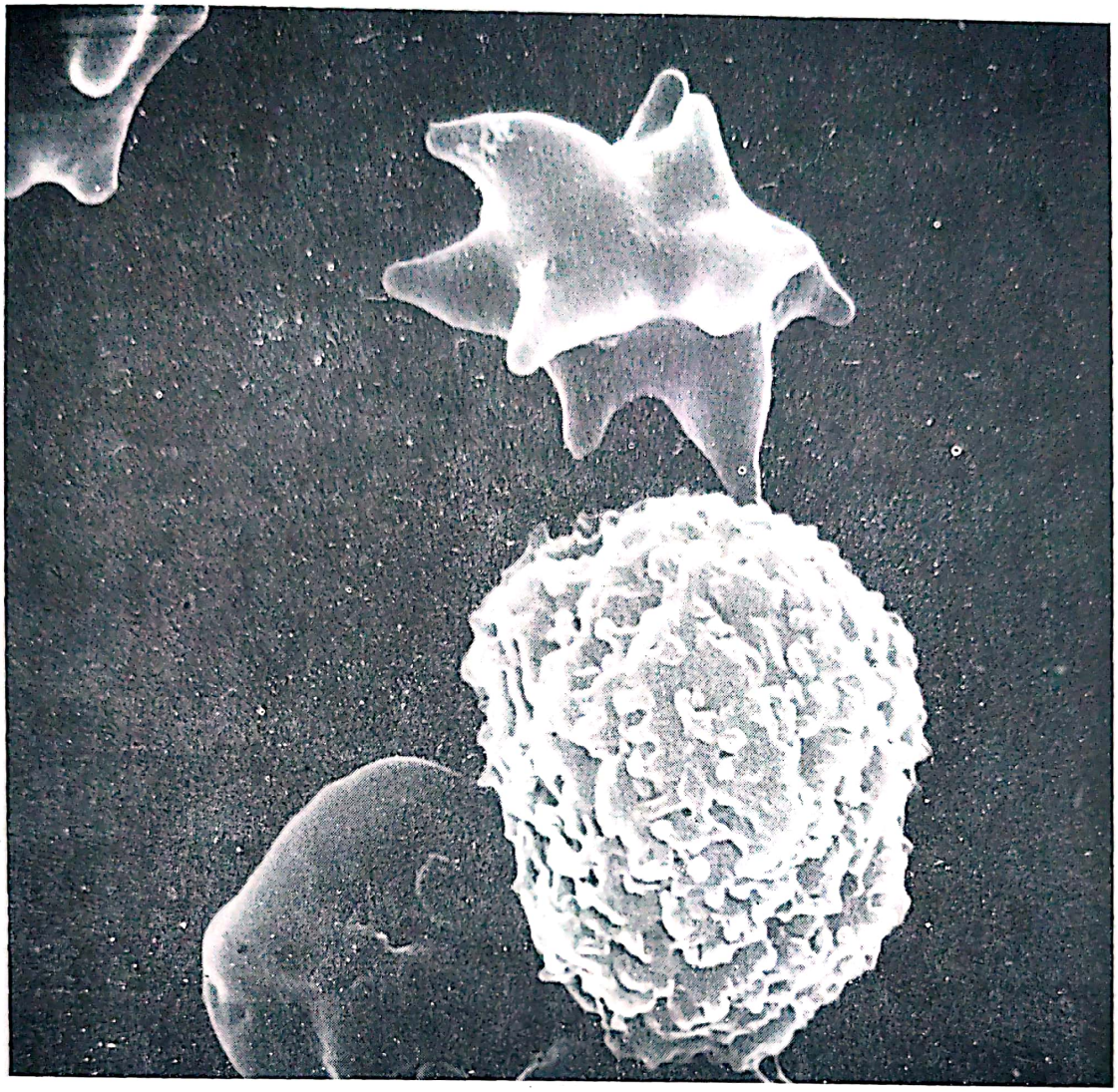


Fig. III-IV/16 x 11 000 Leucocitoconcentrat de porc. Fenomen Killer — limfocit „K".

Scanned with OKEN Scanner

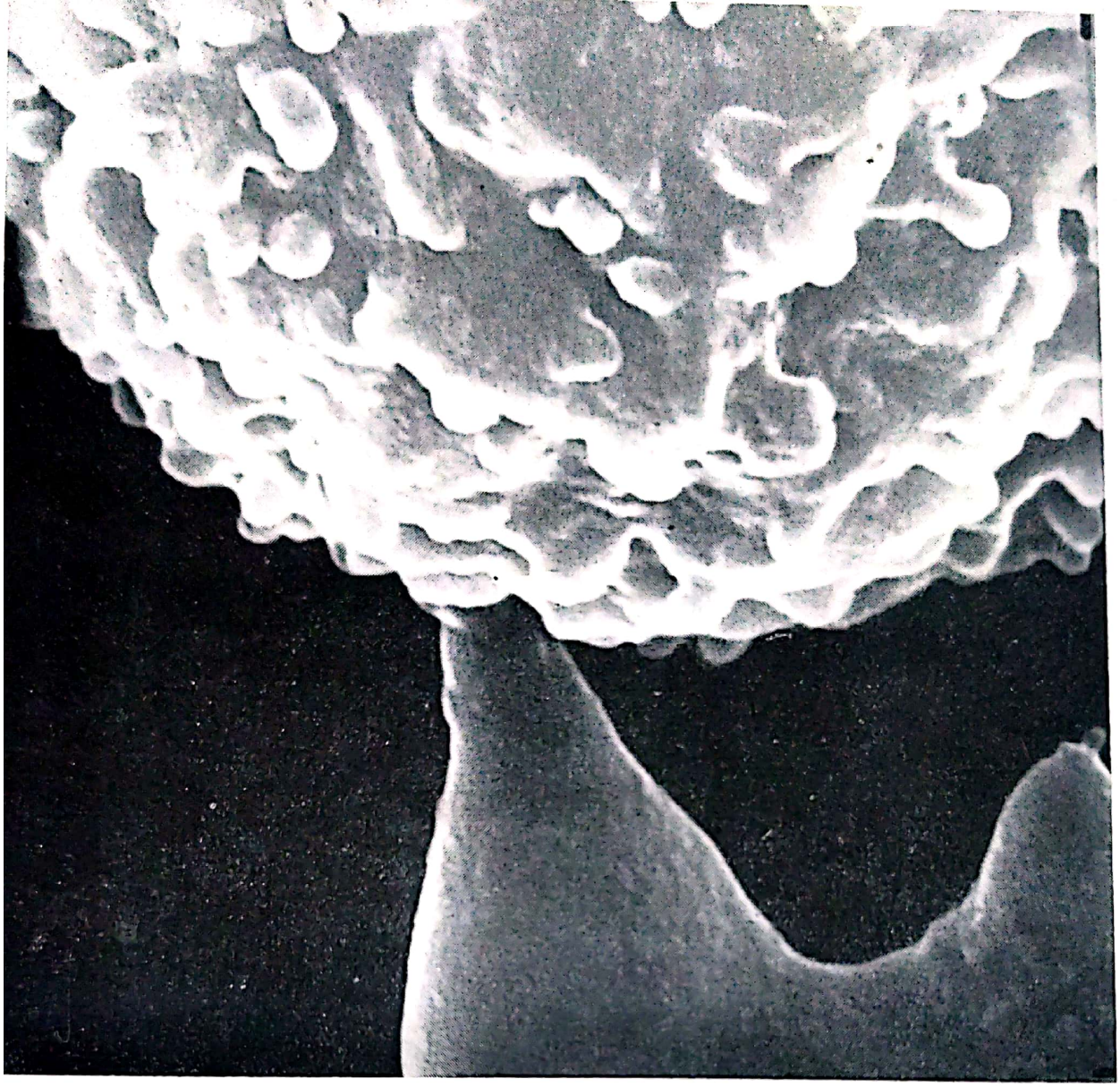


Fig. III-IV/17 × 95 000 Leucocitoconcentrat de porc. Limfocit „K“ fenomen Killer spontan.

Scanned with OKEN Scanner

6.2. Linia histio-monocitară

Este una dintre cele mai importante linii celulare, deoarece concură la formarea mecanismelor de apărare a organismului, în special prin celulele macrofagice și histiocitare. În plus, este o serie foarte reactivă participînd la toate stările reacționale ale organismului, avînd și o plasticitate deosebită.

6.2.1. Monoblaștii și histioblastele

Sînt celulele cap de serie ale liniei histio-monocitare. Sînt elemente de talie mare, cuprinsă între 25—30 microni, de formă ușor cuboidală avînd pe suprafața celulară mici mantii care se răsfrîng, dînd o imagine extrem de caracteristică. Frecvența lor în sîngele periferic este foarte redusă între 0,01% la om și 0,07% la ovine. (fig. III—IV 18).

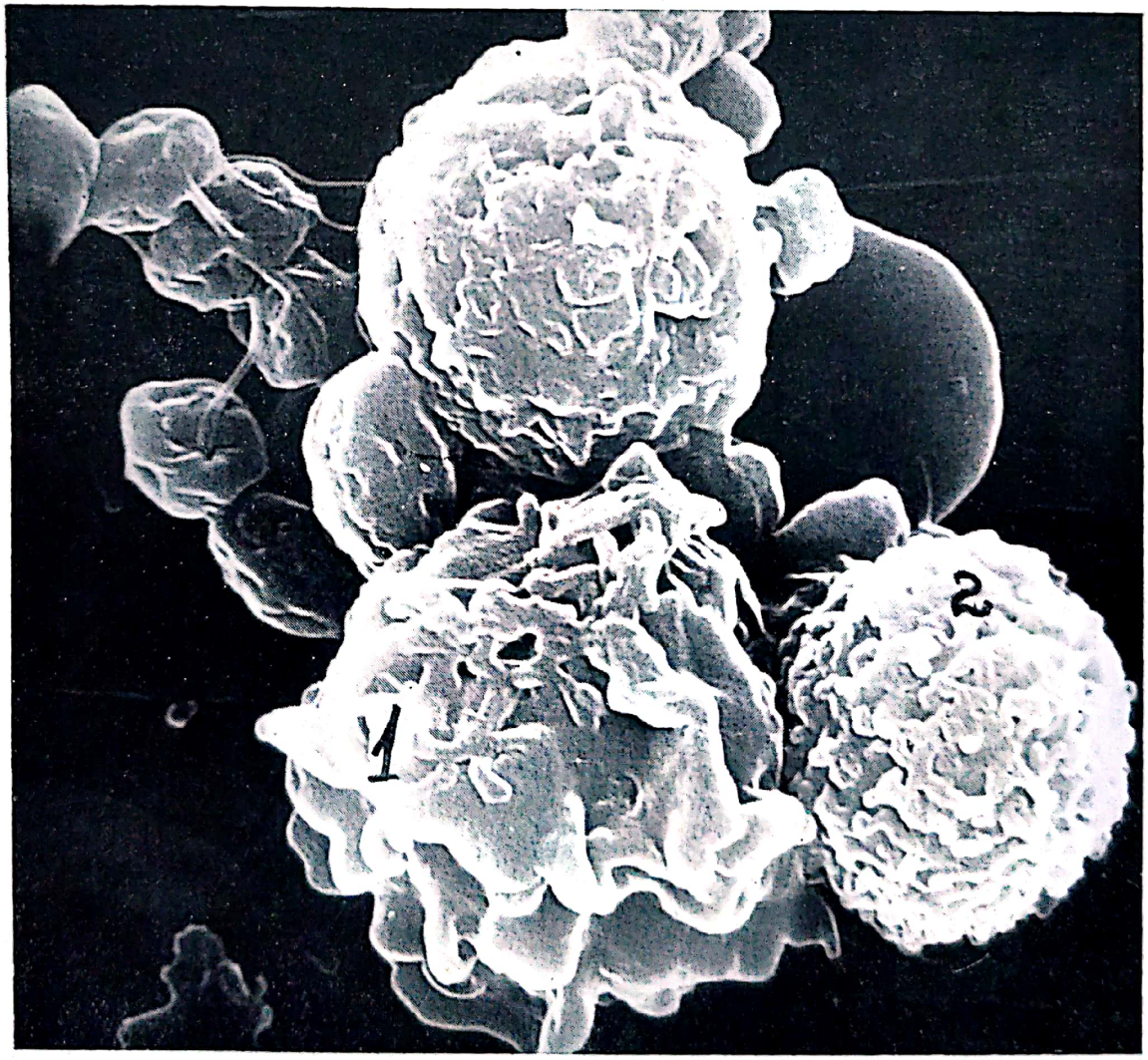


Fig. III-IV/18 x 20 000 — Leucocitoconcentrat de bovine. Monoblast (1) alături de un limfocit „B" (2).

Scanned with OKEN Scanner

6.2.2. **Histiocitele**

Au o talie mai mică decît precedentele, cuprinsă între 24—28 microni. Sînt celule mai rotunde avînd suprafața puternic festonată de întretăierea și suprapunerea mai multor mantii. Provin din maturarea incompletă a monoblastelor și au o frecvență în sîngele periferic cuprinsă între 0,5%, la păsări și 2%, la bovine.

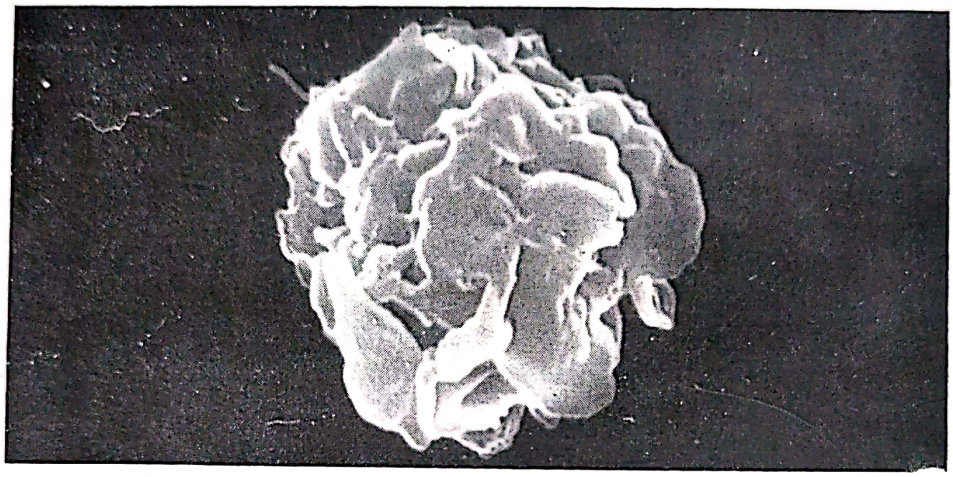


Fig. III-IV/19 × 20 000 — Sînge periferic de porc. Monocit cu aspect tipic avînd o mulțime de mantii care se răsfrîng în mai multe planuri.

Fig. III-IV/19 bis. × 20 000 — Sînge periferic de bovine — Monocit relativ asemănător cu cel de porc.

6.2.3. Monocitele

Sînt celule apropiate ca aspect de histiocite, diferențiindu-se de ele numai prin talia celulară care este cuprinsă între 20—25 microni. Frecvența în seria animală este variabilă între 5%, la ovine și 1%, la păsări (fig. III—IV, 19, 19 bis).

6.2.4. Histiocitele macrofagice

Reprezintă unele dintre cele mai importante celule pentru sistemul de apărare al organismului. Sînt celule de talie mare, cuprinsă între 26—30 microni, fiind pline de neregularități pe suprafață, avînd o serie de prelungiri citoplasmatice, probabil cu un important rol imunologic. În seria animală nu prezintă diferențieri notabile (fig. III—IV, 20, 21).

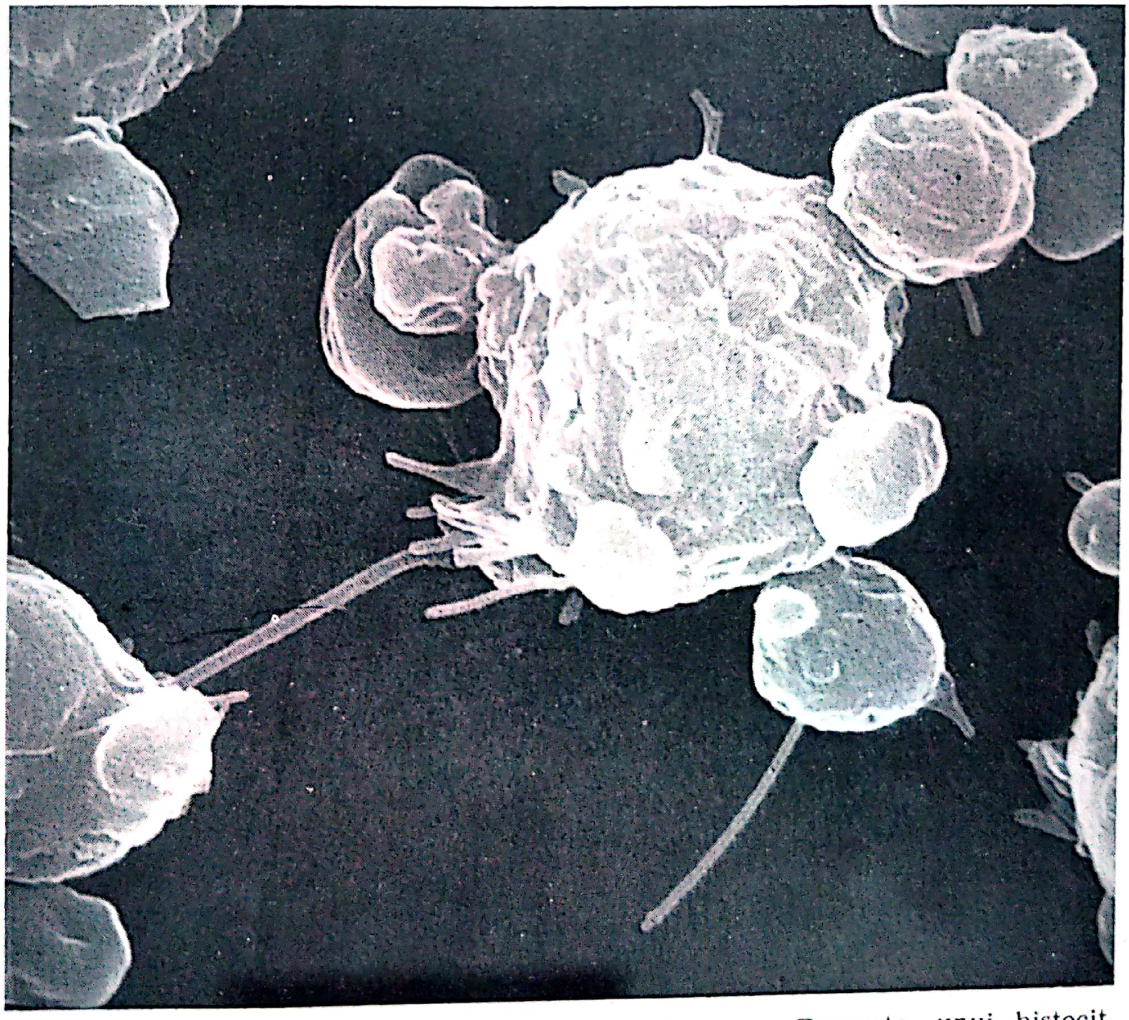


Fig. III-IV/20 × 18 000 Leucocitoconcentrat de porc. Prezența unui histocit macrofagic cu multiple ramificații ale membranei celulare.

Scanned with OKEN Scanner

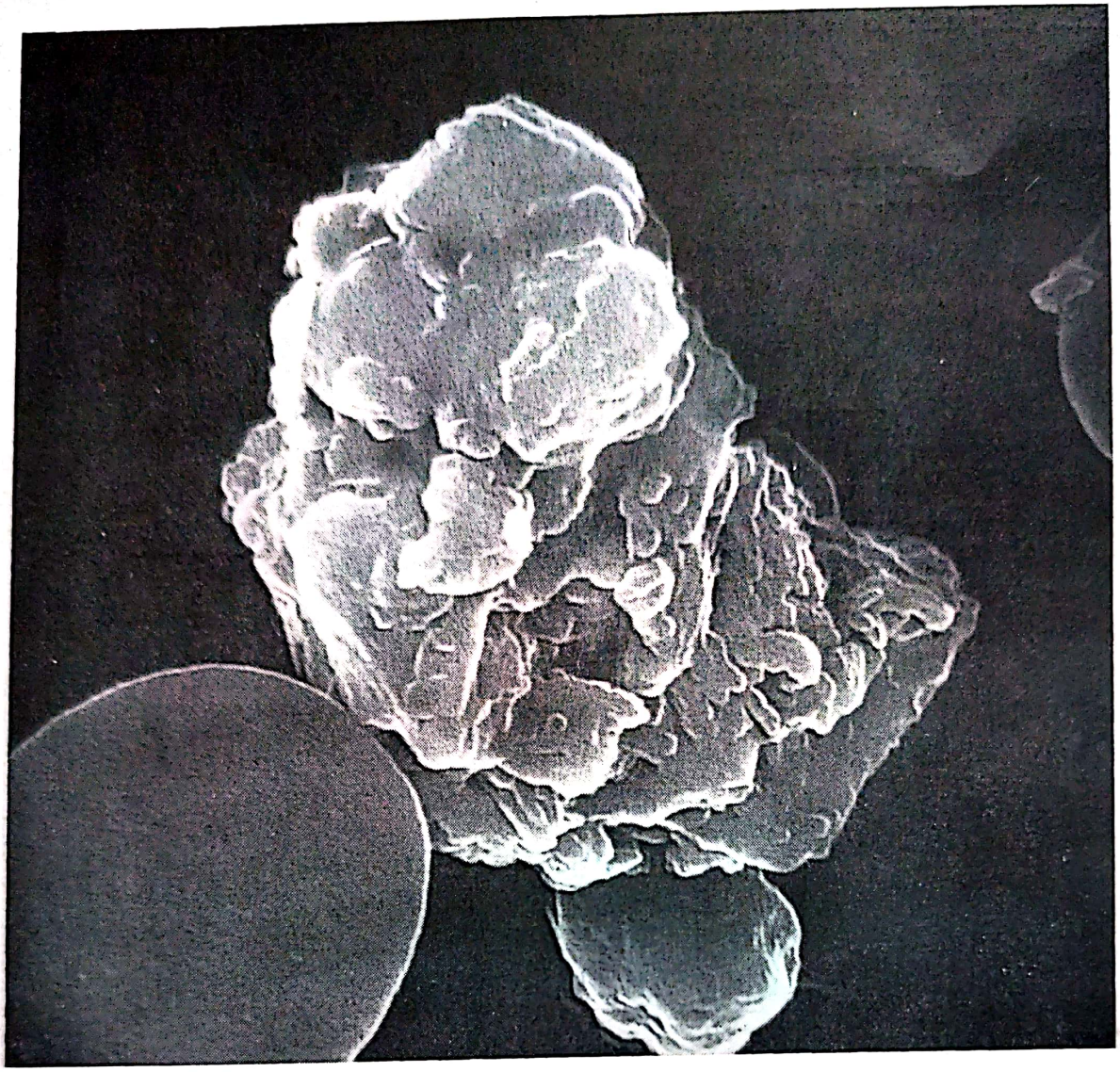


Fig. III-IV/21 × 20 000 — Sînge periferic de pasăre. Histiocitul macrofagic are structura cea mai curioasă și bine diferențiată în seria animală.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL IV

ASPECTE DE PATOLOGIE SANGVINĂ ÎN BALEIAJ (SEM)

7. LIMFOAME MALIGNE, ÎN GENERAL

Este bine cunoscută importanţa studierii limfoamelor maligne. Aceasta, ca urmare a faptului că frecvenţa lor, în oncologia comparată, este cea mai mare faţă de alte forme de neoplazii maligne. În afară de dificultăţi epizootologico-epidemiologice care apar, dificultăţile de diagnostic se pot referi la aspectele fundamentale şi practice, toate acestea avînd o strînsă interdependenţă. Studierea aprofundată a limfoamelor maligne arată că orice *cîştig fundamental* se repercutează asupra progresului practic imediat. În acest fel se poate explica extraordinarul salt făcut în ultimii ani în terapeutica limfoamelor maligne cu rezultate actualmente dintre cele mai bune. Toate acestea au avut la bază progresele substanţiale făcute pe anevoiosul drum al cunoaşterii celulelor limfopoezei. Trei condiţii majore stau astăzi la baza diagnosticului corect a limfoamelor maligne :

a) Stabilirea unui diagnostic precoce ;

b) Efectuarea unui minuţios diagnostic diferenţial cu limfopatiile reacţionale ;

c) Evidenţierea corectă a tipului celular cointeresat în proliferare.

Cu toate că, în mare parte, aceste condiţii şi-au găsit rezolvarea, mai rămîn încă multe necunoscute care, probabil, aparţin viitorului, iar — dintre acestea — limfopatiile reacţionale de graniţă (în care aspectele de benign/malign sînt la limită şi, adeseori, greu de delimitat) rămîn marea problemă. Pînă nu de mult singura modalitate de diagnostic în limfopatiile la animale era dată de coroborarea datelor clinice cu microscopia optică după colorarea frotiurilor de : sînge, limfoganglioni, splină şi măduvă hematopoetică cu clasicul May-Grünwald-Giemsa şi cu indiciile obţinute prin folosirea tehnicilor de citochimie şi citoenzimologie.

Apoi, un progres însemnat l-a constituit introducerea testelor imunologice ca mijloc de diagnostic curent, cum sînt imunodifuzia RFC [1], testul RIA [2] şi imunofluorescenţa alături de testul rozetelor, mai recent. Acestea au dat un important impuls cercetării aplicative în domeniul on-

[1] Reacţia de fixare a complementului.
[2] Radioimunoabsorbţia.

Scanned with OKEN Scanner

cologiei comparate. Folosirea microscopiei electronice în baleiaj (SEM) cel mai recent mijloc de investigare, este de preferat față de celelalte mijloace de diagnostic enunțate (vezi tab. II, III, cap. III, IV) și pentru că oferă precizie și profunzime cercetărilor aplicative mai mari. În tabelul III, cap. III—IV este redat locul și importanța examenului prin baleiaj în diagnosticul diferențial între limfoamele maligne și cele reactive. Desigur că metodologia este complexă și fiecare fază de evoluție a unui limfom malign reclamă o anumită comportare diagnostică, dar, totuși, multe cazuri rămîn neclarificate cînd se operează numai cu metodologia clasică de diagnostic. Problema diferențierii și încadrării corecte a unei limfopatii de graniță între benign-reacțional și malign este în general dificilă dar, odată cu întrebuințarea largă a examenului electronoptic în baleiaj (SEM), se oferă o nouă posibilitate care se înscrie prioritar, făcînd un util și dificil diagnostic diferențial. Sînt situații cînd examenul electronoptic în baleiaj (SEM) dă indicații prețioase în munca de elaborare a unui diagnostic corect de limfopatie malignă cum sînt :

1) *În limfoproliferările cu celule de talie mică,* avînd nucleolii estompați la colorațiile obișnuite optice, în baleiaj (SEM) se poate clarifica dacă este vorba de elemente adulte limfoide normale, leucemice sau microblastice.

2) Cu ajutorul examinării în baleiaj (SEM) se poate face un prognostic privind evoluția limfoamelor maligne prin identificarea momentului de sarcomatizare a celulelor leucemice (decide agravarea procesului) sau de debut a procesului malign al limfomului.

3) Examinarea în baleiaj (SEM) a limfoamelor maligne diferențiază proliferările limfocitare „T“ de cele „B“.

După părerea noastră tehnica de examinare în baleiaj (SEM) trebuie să se extindă în orice laborator central unde se diagnostică *hemopatii maligne* și să devină o *tehnică de rutină,* ca cea de microscopie optică, deoarece este rapidă, ușor de executat, ușor de interpretat și ieftină, dotările putîndu-se face numai cu microscopul electronic tip „Scanning“ care e mult mai ieftin decît un microscop electronic în transmisie sau mixt.

Din capitolul II a reieșit tehnica simplă și rapidă de executare a specimenelor (preparate) care, este recomandabil să folosească sîngele periferic după o prealabilă concentrare a leucocitelor ; aprecierea tipurilor de celule se face după :

— forma lor ;

— talia ce poate fi rapid stabilită și în mod exact ;

— elemente de morfostructură tridimensională a suprafețelor celulare, putînd distinge elementele limfoide, monocitare, neoplazice de alte elemente, cît și de hematii.

Desigur că într-un viitor extrem de apropiat, probabil că încă 2 metode vor deveni de rutină, care vor ajuta diagnosticul : idiograma și examenul virusologic electronoptic pentru decelarea virusurilor ARN de tip „C“ (vezi tab. II, cap. III—IV).

Scanned with OKEN Scanner

7.1. Aspecte de transformare sarcomatoidă a elementelor limfo-monocito-proliferative

În cursul evoluției unei leucemii sau chiar la debutul unui limfom malign se poate întîlni un aspect sarcomatos citemic. Desigur că aceasta are o importanță majoră pentru că stabilirea unui diagnostic de leucemie limfoidă cronică simplă, cu un prognostic infinit mai bun decît un limfosarcom citemic plin de monstruozități și atipii celulare în sîngele periferic. Aceste date se stabilesc în baleiaj (SEM) după :

7.1.1. Forma și mărimea celulelor sarcomatoase

Celulele apar cu variate forme de la elipsoidale, piriforme, ovoide, curbate, pînă la apariția de forme bizare : coif, treflă, amforă. Talia acestor celule este variabilă, în funcție de tipul celular (limfoid sau monocitar) cu variații între 30—70 microni. Celulele din seria monocitară sînt mai mari decît cele din seria limfocitară.

7.1.2. Morfoarhitectura de suprafață

Față de ceea ce vom prezenta la partea descriptivă a leucemiilor comparate, aici vom trece în revistă detaliile de suprafață celulară proprii celulelor sarcomatoase. Dacă în cazul leucemiilor vom comenta imaginile de la toate speciile analizate (bovine, ovine, cabaline, porc, păsări și om) în cazul sarcomatozei citemice ce le vom descrie, provin de la bovine, cabaline, păsări și om.

Bovine — celulele sînt destul de neregulate, de talie mai mică ca la celelalte specii, cuprinsă între 34—40 microni. Aspectul suprafeței celulare este foarte neregulat, prezentînd mantii care se răsfrîng pe părțile laterale ale celulei și noduli de mari dimensiuni. În fig. III—IV 22, suprafața celulei este de circa 85 cm^2, suprafața unui nodul ajunge în medie la 8,75 cm^2, raportul între ele fiind foarte mic. Spațiul de separare a două răsfrîngeri de mantie este de circa 6,5 nano-microni (fig. III—IV 22).

Cabaline — în cazul proliferării sarcomatoase a celulelor seriei limfoide celulele sînt de formă extrem de neregulată cu multe încrețituri pe suprafața celulară și cu resturi fine de microvili scurți și groși (fig. III—IV 23). Pe suprafața limfoblaștilor apar la început discret (fig. III—IV 25) și apoi în număr din ce în ce mai mare depozite sub formă de inflorescență conopidiformă care, odată cu evoluția bolii, acoperă celula în totalitate (fig. III—IV 26, 27), mergînd pînă la deformarea acesteia (fig. III—IV 29). Acest aspect în „vivo" este practic identic cu cel în „vitro" (fig. III—IV 27), unde depunerile pe suprafața celulară cu aspect conopidiform sînt *totalitare*. Talia acestor celule este mult mai mare decît la bovine, variind între 40—70 microni. (Fig. 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

Păsări — proliferările sarcomatoase au îmbrăcat la păsări numai neregularități ale suprafeței celulare sub formă de noduli (blepsuri) de mărimi variabile de la forme mici (fig. 33) la altele gigante ce dau un aspect foarte boselat celulei (fig. 34). Talia celulelor este cuprinsă între 40—52 microni (fig. III—IV 33, 34, 35).

Scanned with OKEN Scanner

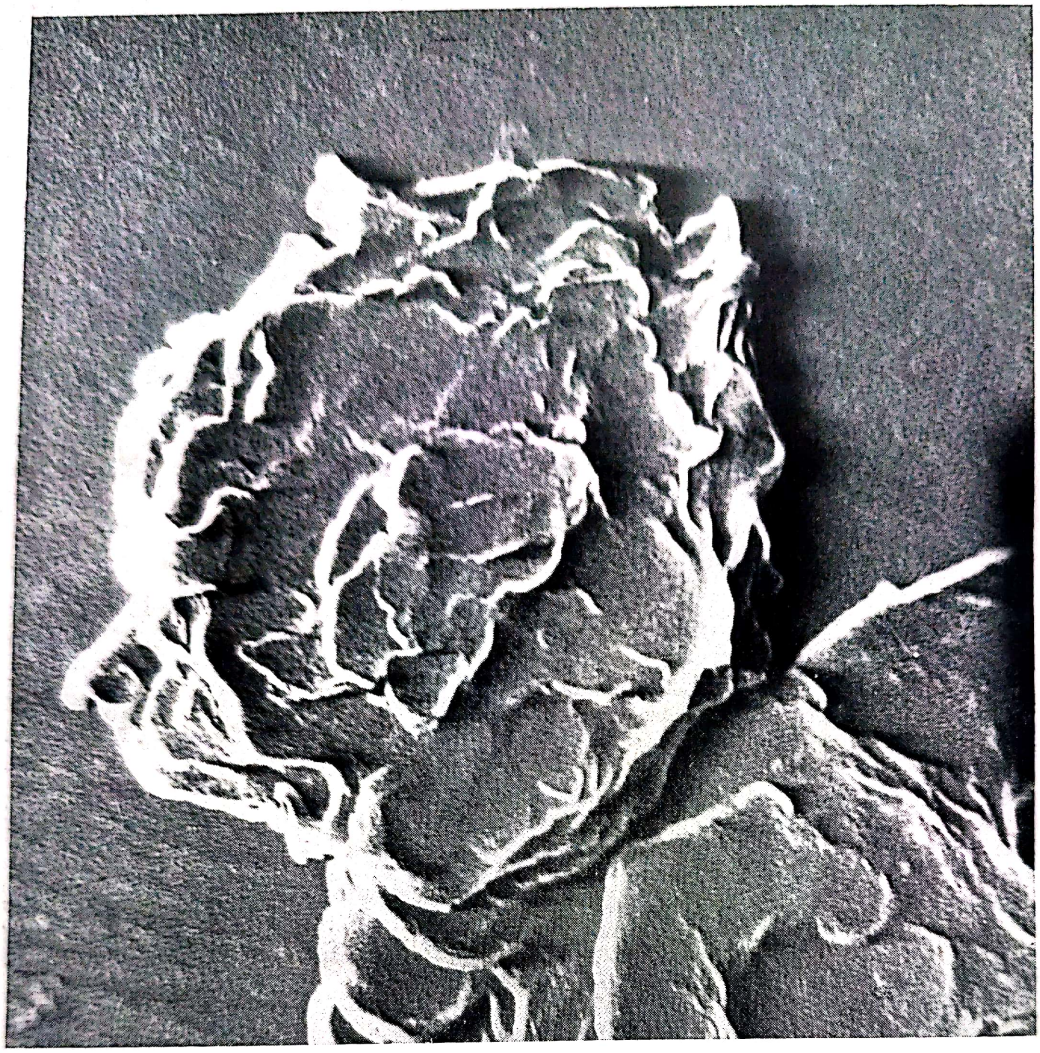


Fig. III-IV/22 × 25 000 Sînge periferic de vacă — Leucoză tumorală ; celulă limfosarcomatoasă, văzută prin tehnica A.C.

Scanned with OKEN Scanner

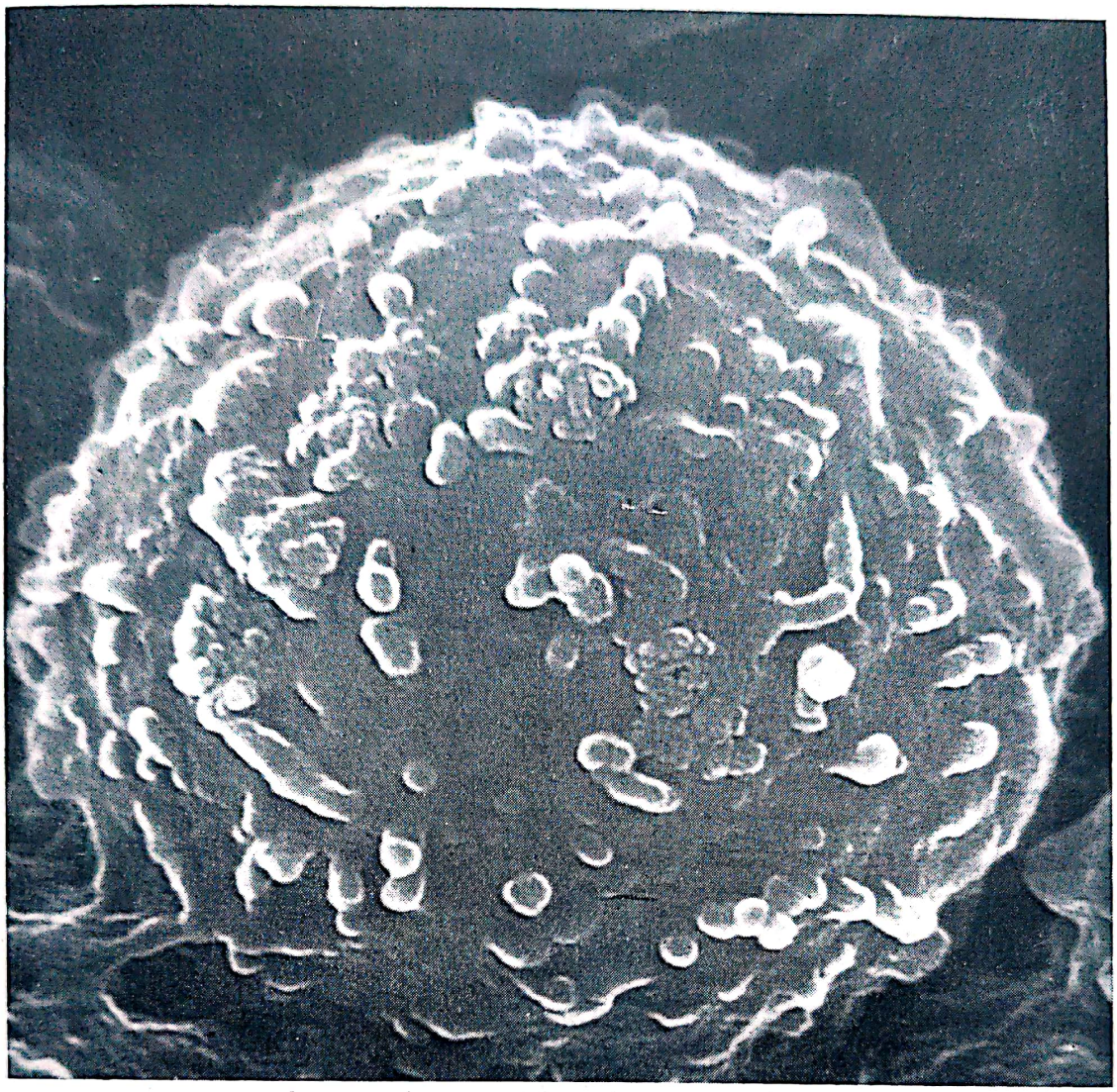


Fig. III-IV/23 x 50 000 Leucocitoconcentrat de cal — Anemie infecțioasă. Prezența unui limfoblast „B" atipic care din loc în loc are insule cu aspect conopidiform. Debut sarcomatos. Acestea cresc în mărime odată cu evoluția bolii, acoperind toate structurile de suprafață ale celulei (vezi fig. 25, 26, 27, 28, 29, 30).

Scanned with OKEN Scanner

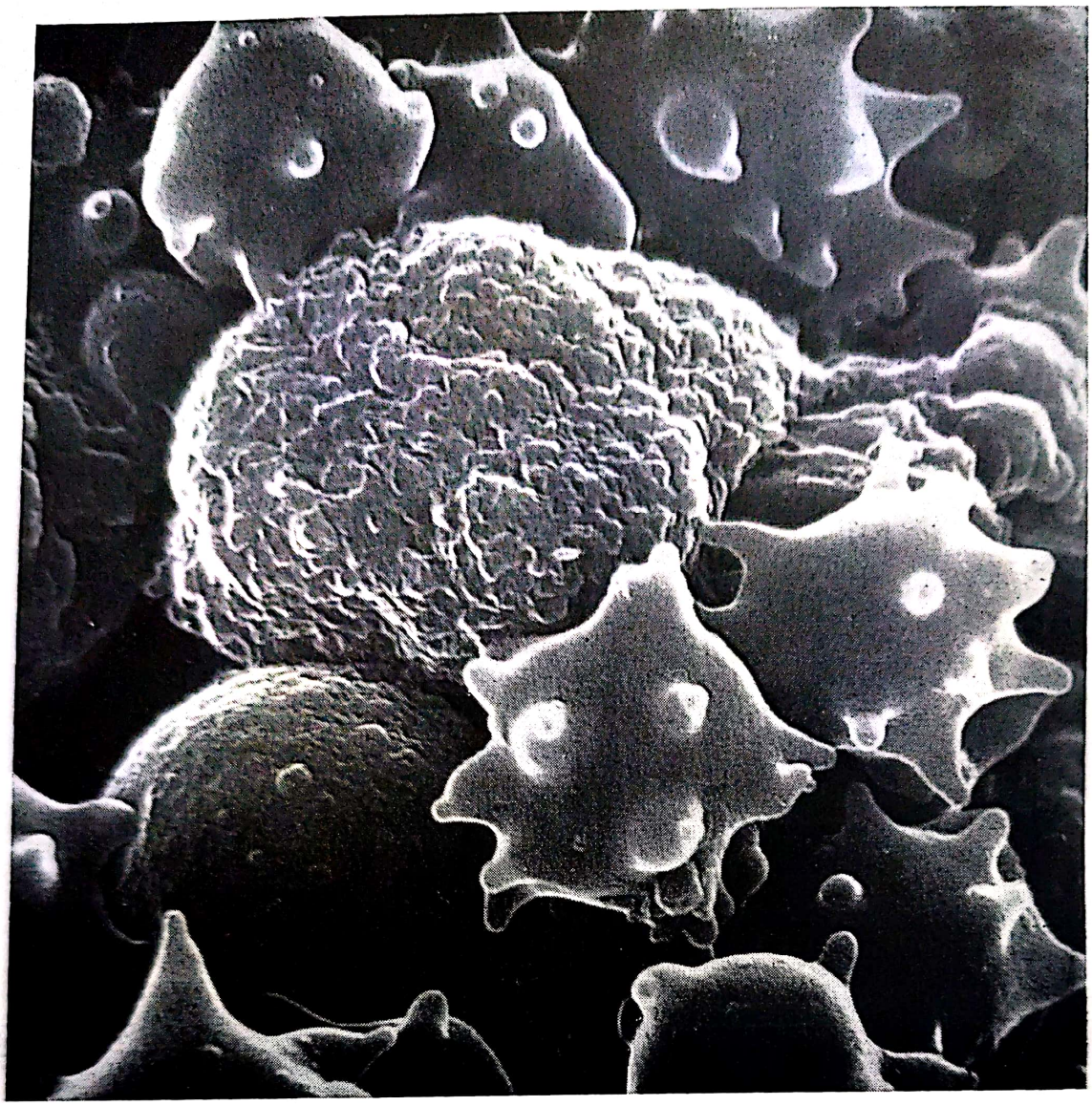


Fig. III-IV/24 x 7 500 Sînge periferic de cal. Anemie infecţioasă cronică. O celulă sarcomatoasă histiocitară pe cale de a se transforma în hiary-Cell.

Scanned with OKEN Scanner

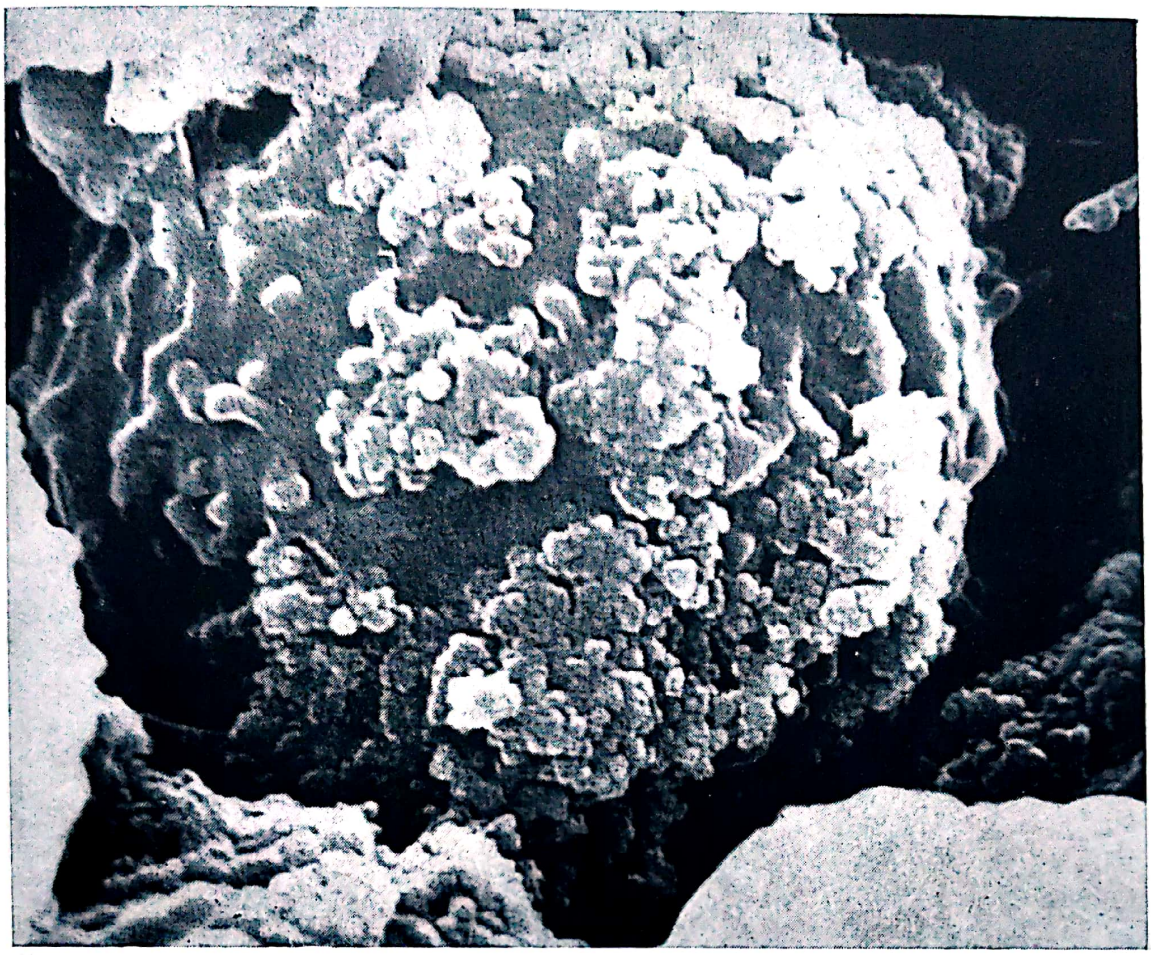


Fig. III-IV/25 x 35 000. Leucocitoconcentrat de cal — Anemie infecțioasă cronică. Celulă sarcomatoasă asemănătoare cu cea din fig. 23, dar aspectul conopidiform al proliferării microvililor este acum dominant.

Scanned with OKEN Scanner

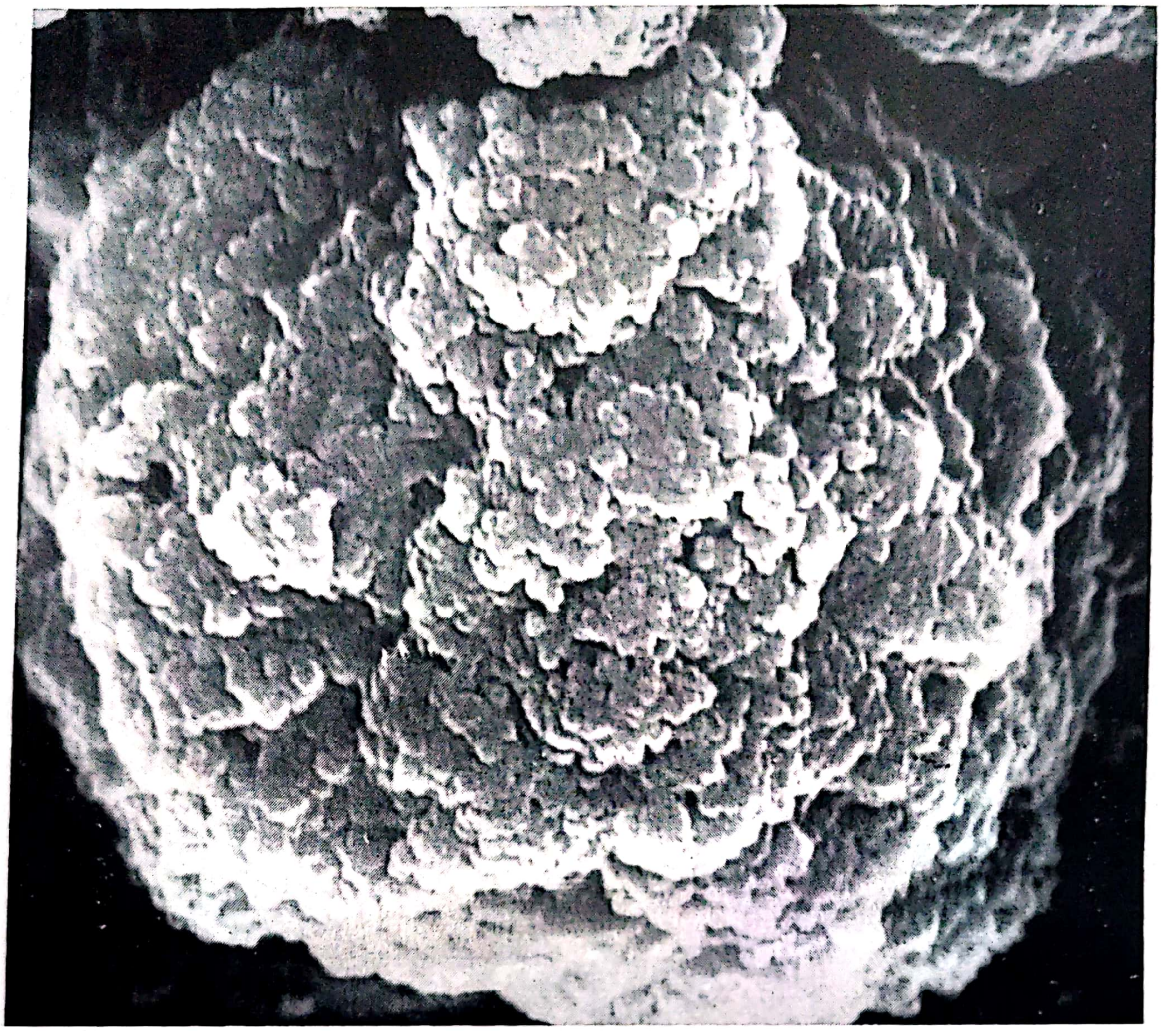


Fig. III-IV/26 x 30 000. Leucocitoconcentrat de cal — Anemie infecțioasă cronică. Celulă sarcomatoasă cu aspect conopidiform totalitar.

Scanned with OKEN Scanner

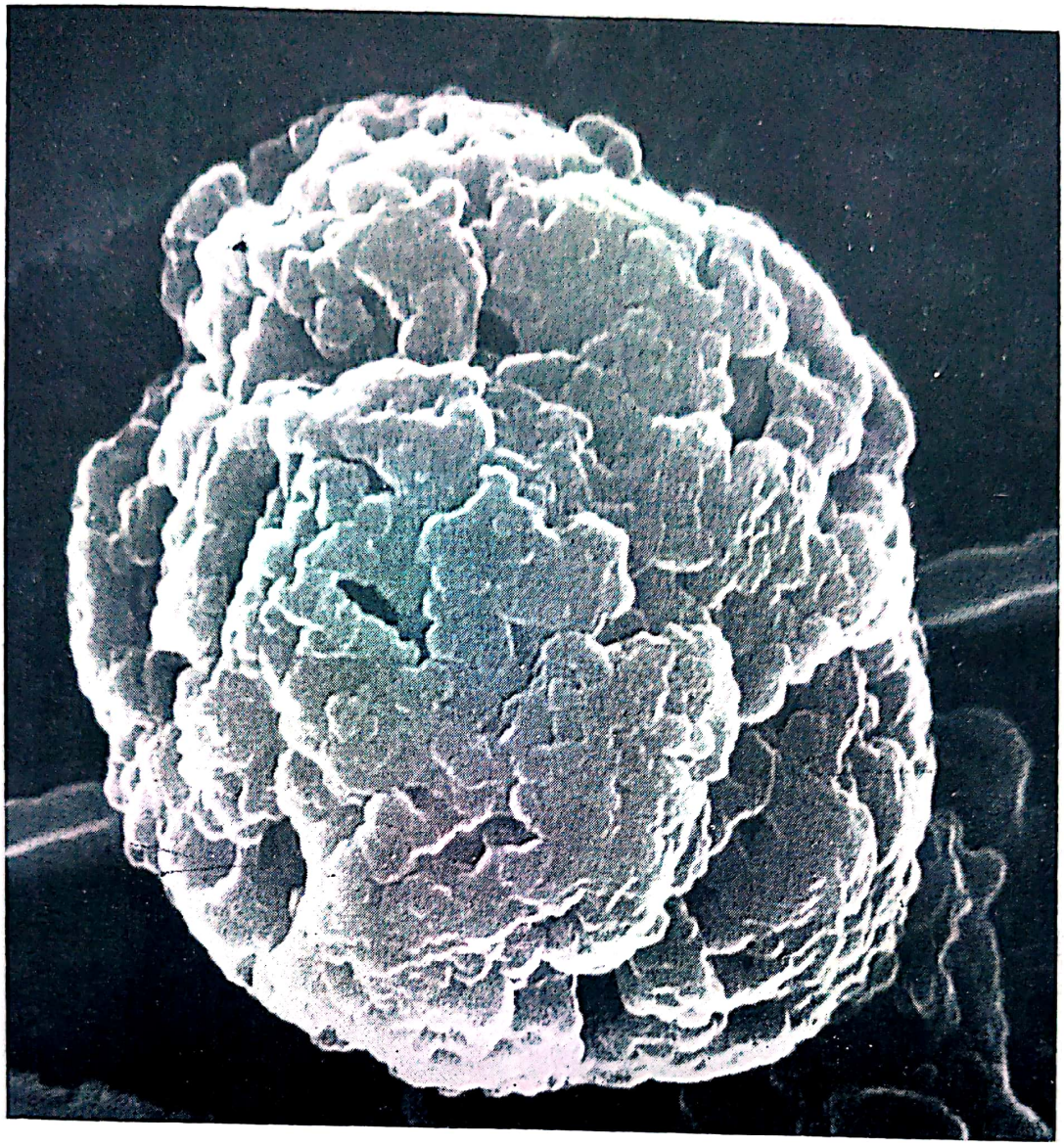


Fig. III-IV/27 x 21 000. Culturi de celule de cal cu anemie infecţioasă cronică. Suprafaţa unei celule sarcomatoase după 72 h de cultivare în prezenţa P.H.A. este identică cu cele anterioare descrise „in vivo".

Scanned with OKEN Scanner

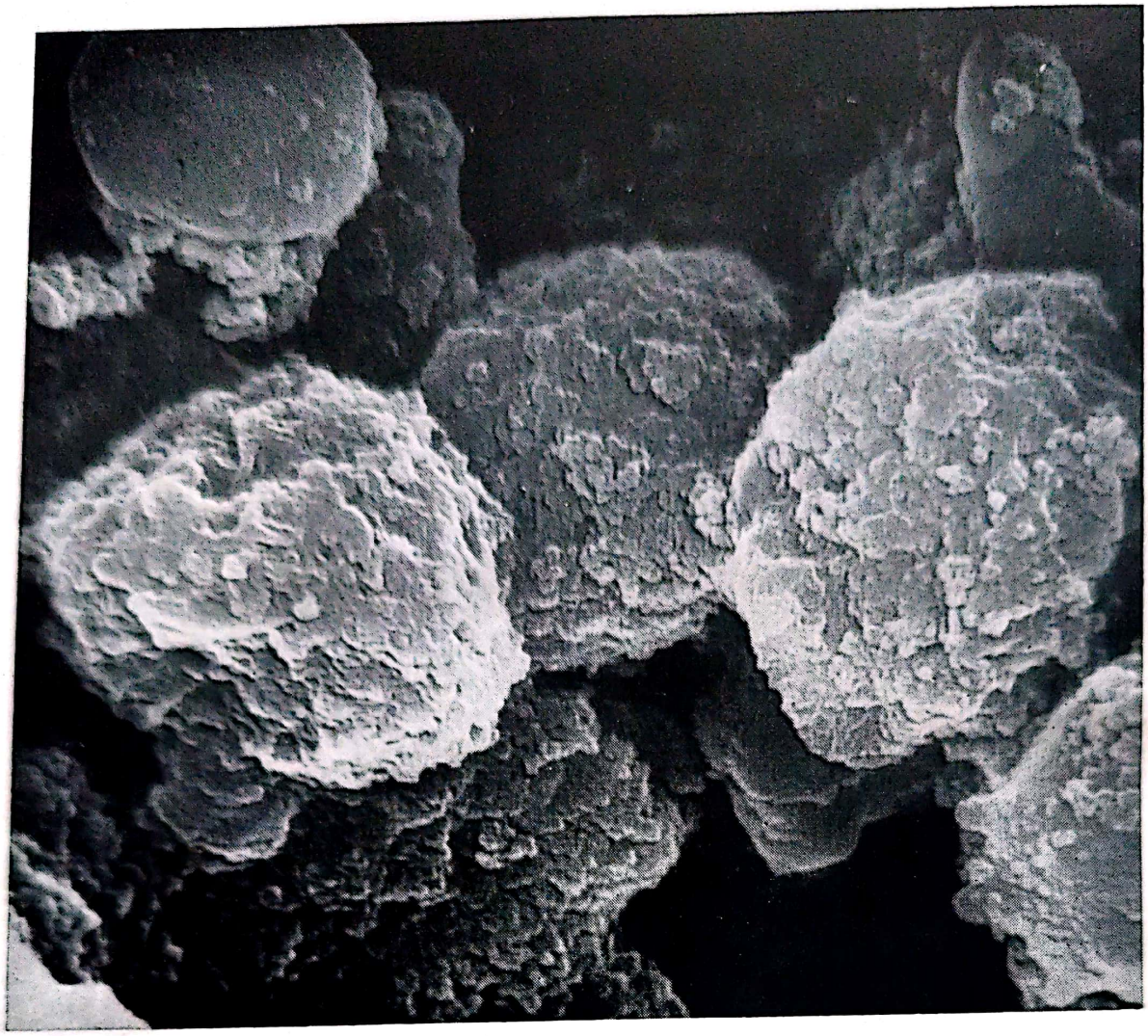


Fig. III-IV/28 x 7 000. Leucocitoconcentrat de cal — Anemia infecţioasă cronică. Grup de celule sarcomatoase cu aspect conopidiform al suprafeţei.

Scanned with OKEN Scanner

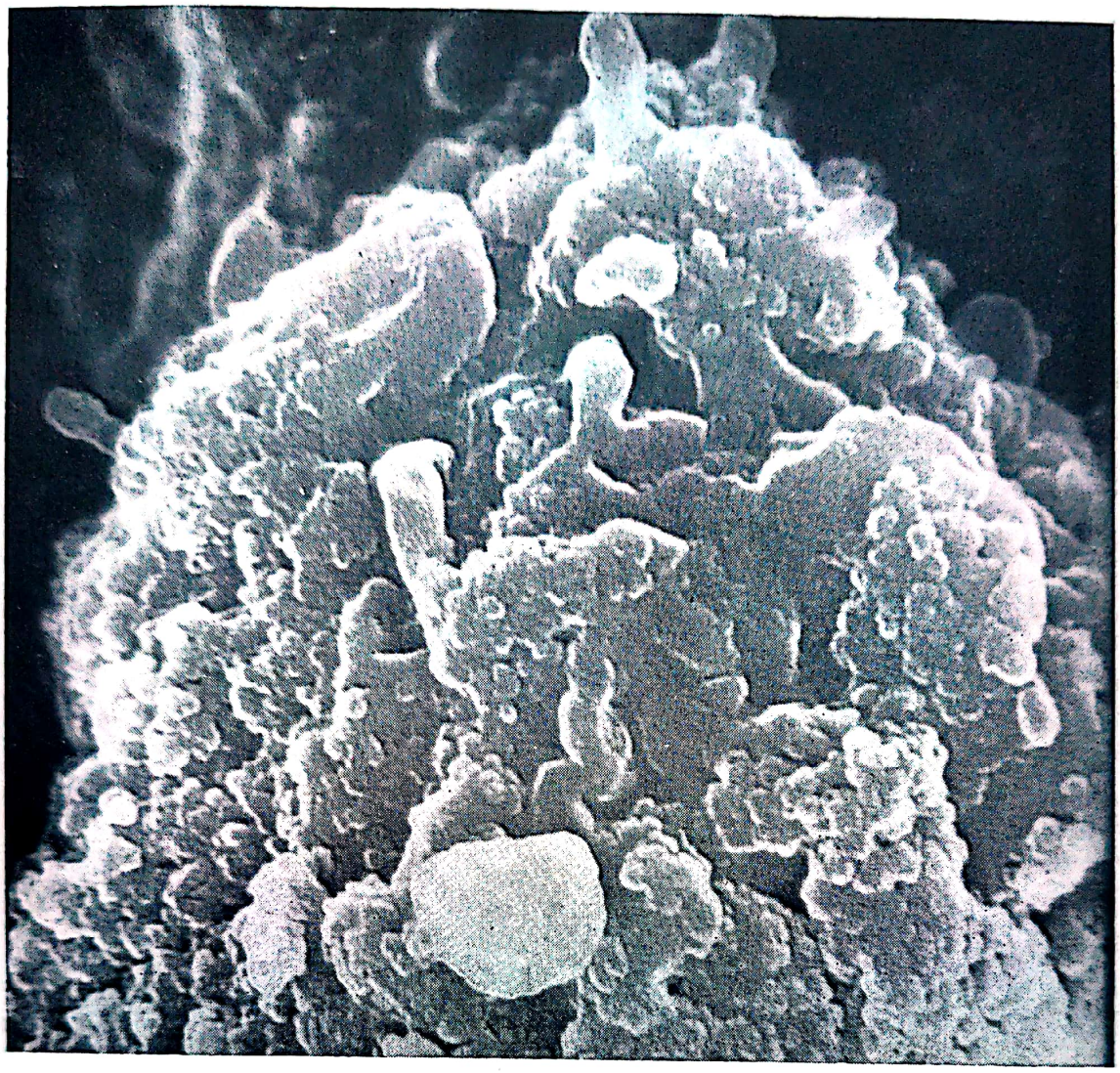


Fig. III-IV/29 x 50 000 Leucocitoconcentrat de cal — Anemia infecțioasă cronică. Detalii pe suprafața unei celule sarcomatoase.

Scanned with OKEN Scanner

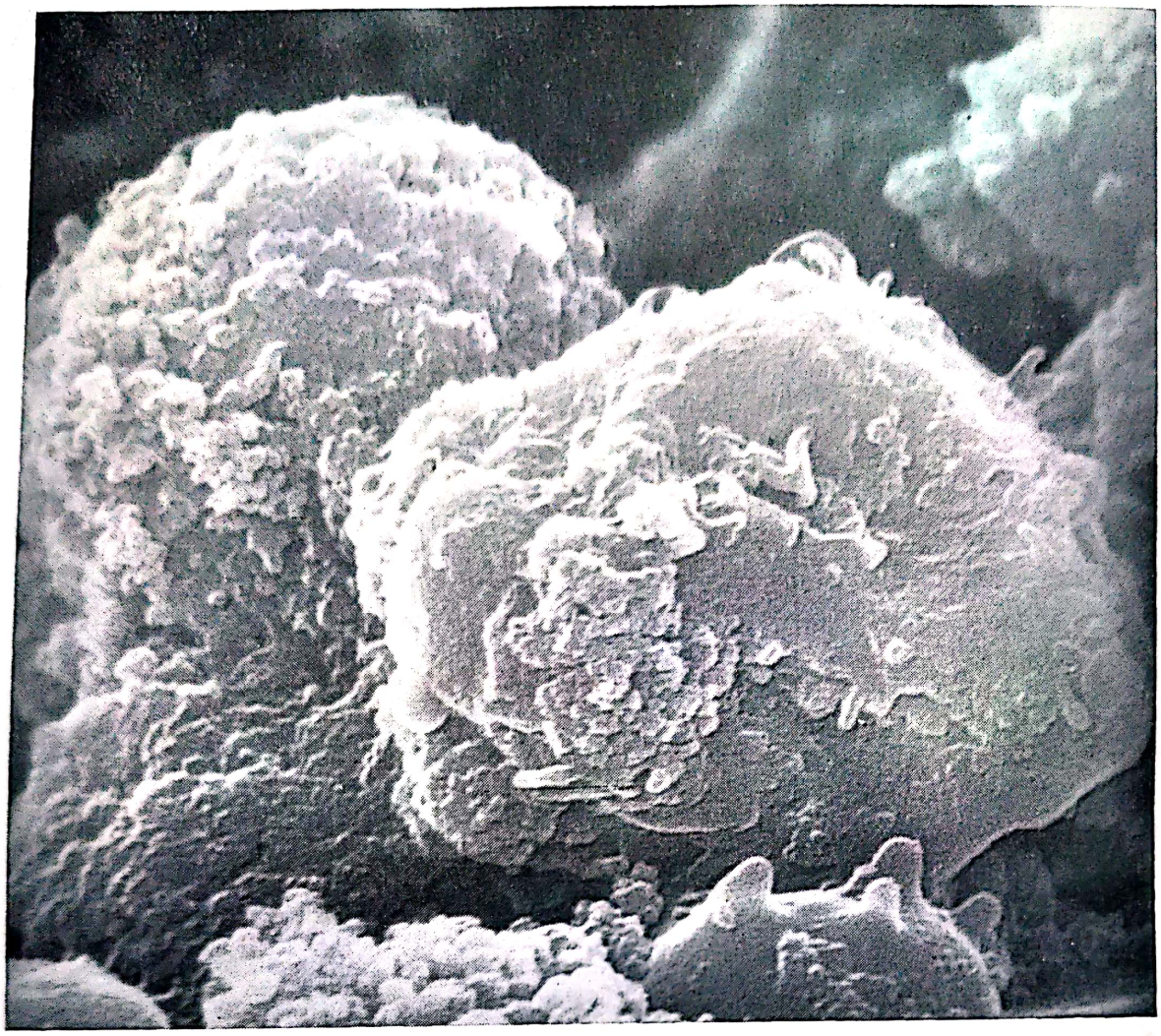


Fig. III-IV/30 x 17 000. Leucocitoconcentrat de cal — Anemia infecţioasă cronică. Grade variate de aspecte conopidiforme ale celulelor sarcomatoase. Se observă bine originea acestora fiind hipertrofia-anaplazică exagerată a microvililor.

Scanned with OKEN Scanner

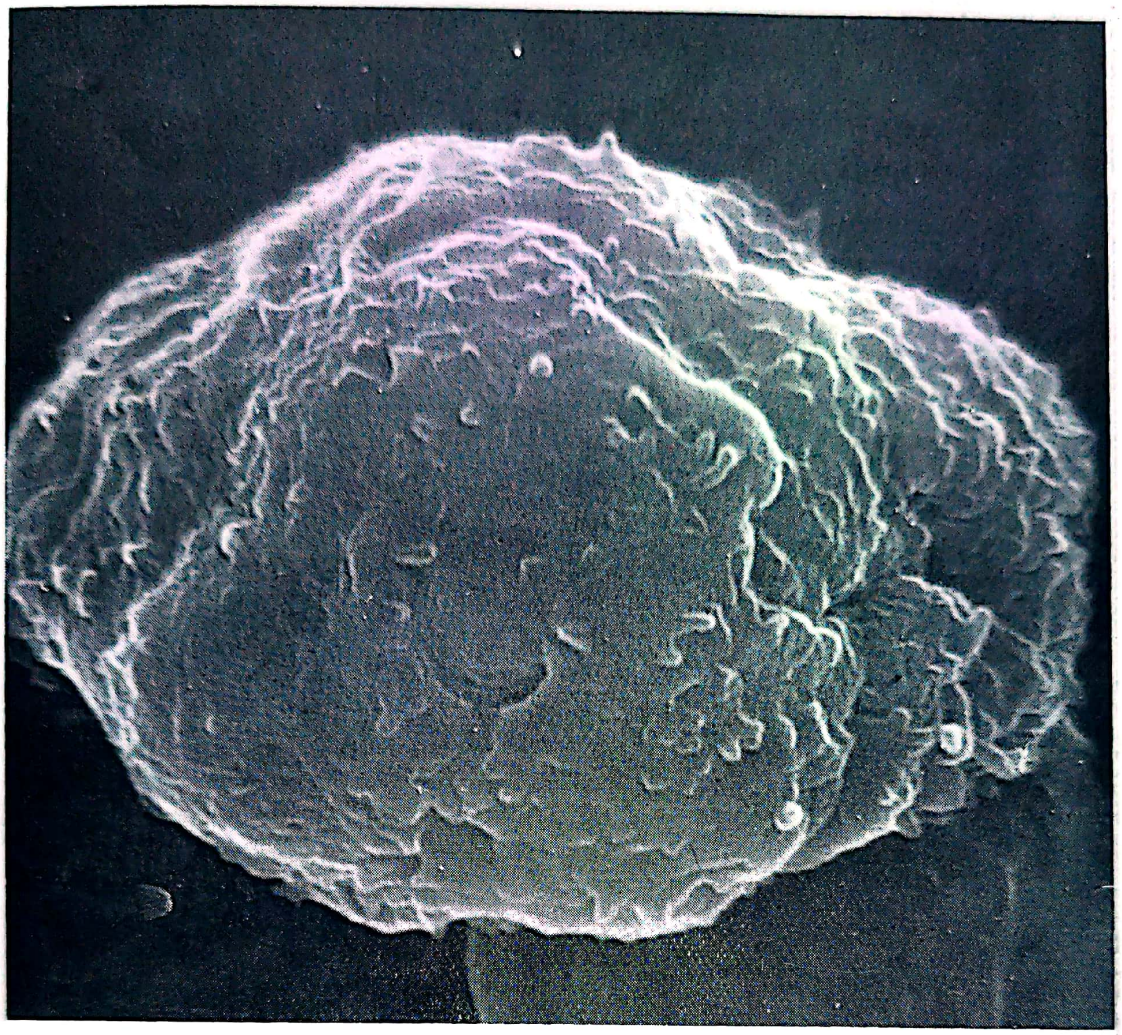


Fig. III-IV/31 x 20 000 Sînge periferic de cal — Anemie infecţioasă acută. Celulă sarcomatoasă nediferenţiată.

Scanned with OKEN Scanner

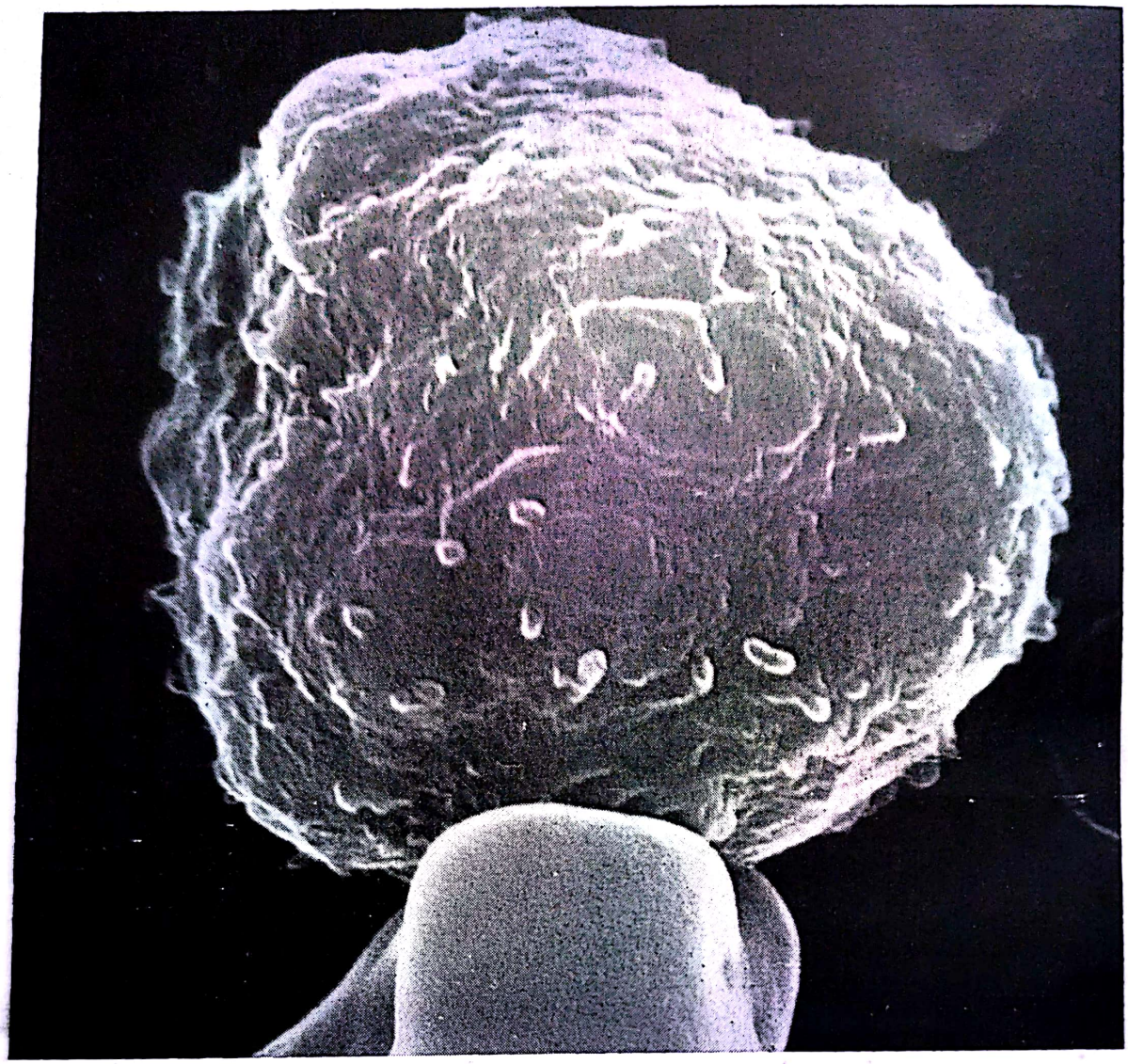


Fig. III-IV/8 x 42 000 Leucocitoconcentrat la om normal. Limfocit „B" — presarcomatoasă nediferențiată.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. III-IV/33 x 20 000 Sînge periferic pasăre. Limfosarcom citemic. Relativ același aspect cu cel de la om consecutiv nodulilor („blebsuri") pe suprafața celulelor tumorale.

Scanned with OKEN Scanner

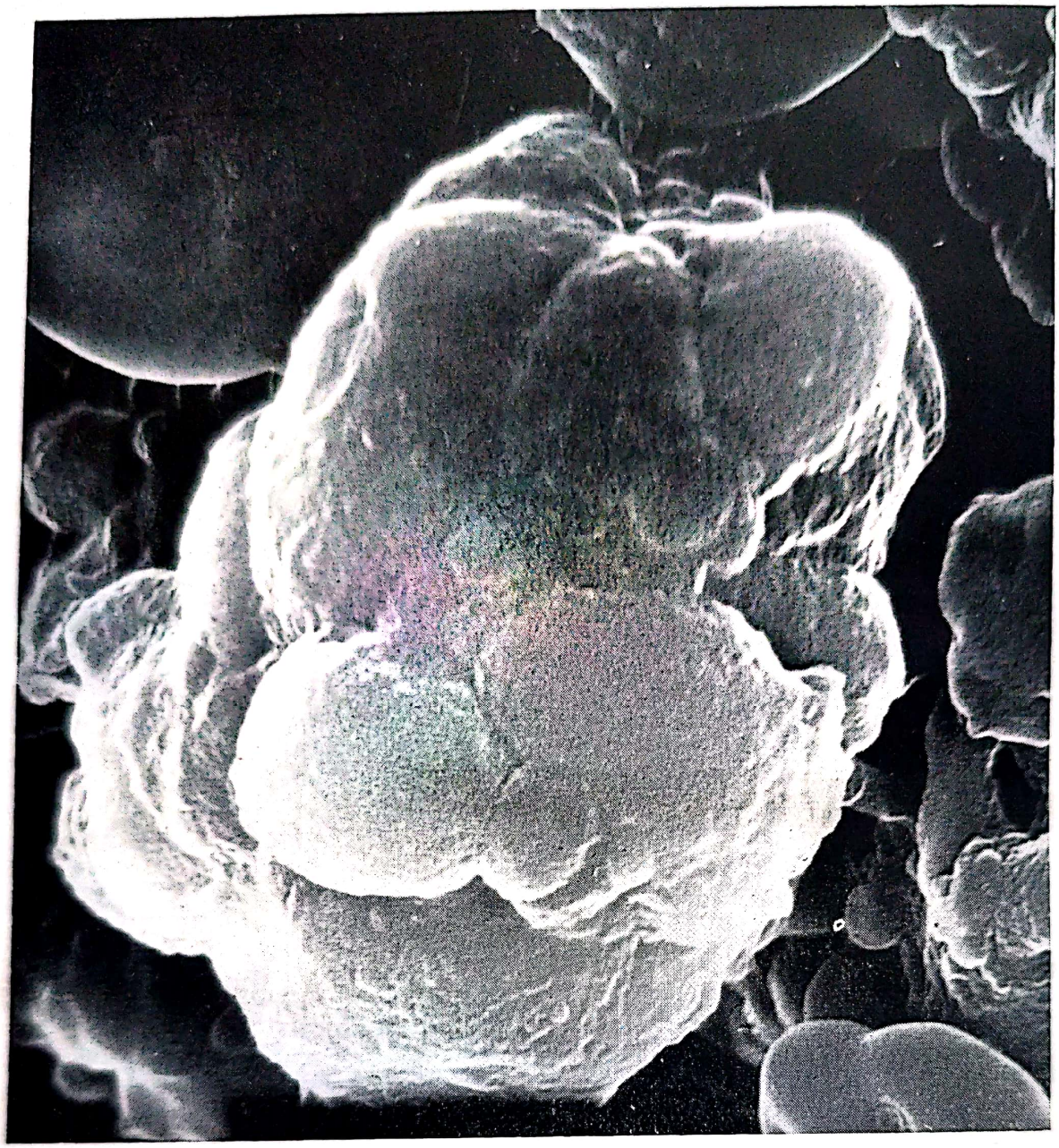


Fig. III-IV/34 x 20 000 Sînge periferic pasăre — Limfosarcom citemic. Relativ aspect apropiat cu cele 2 anterioare.

Scanned with OKEN Scanner

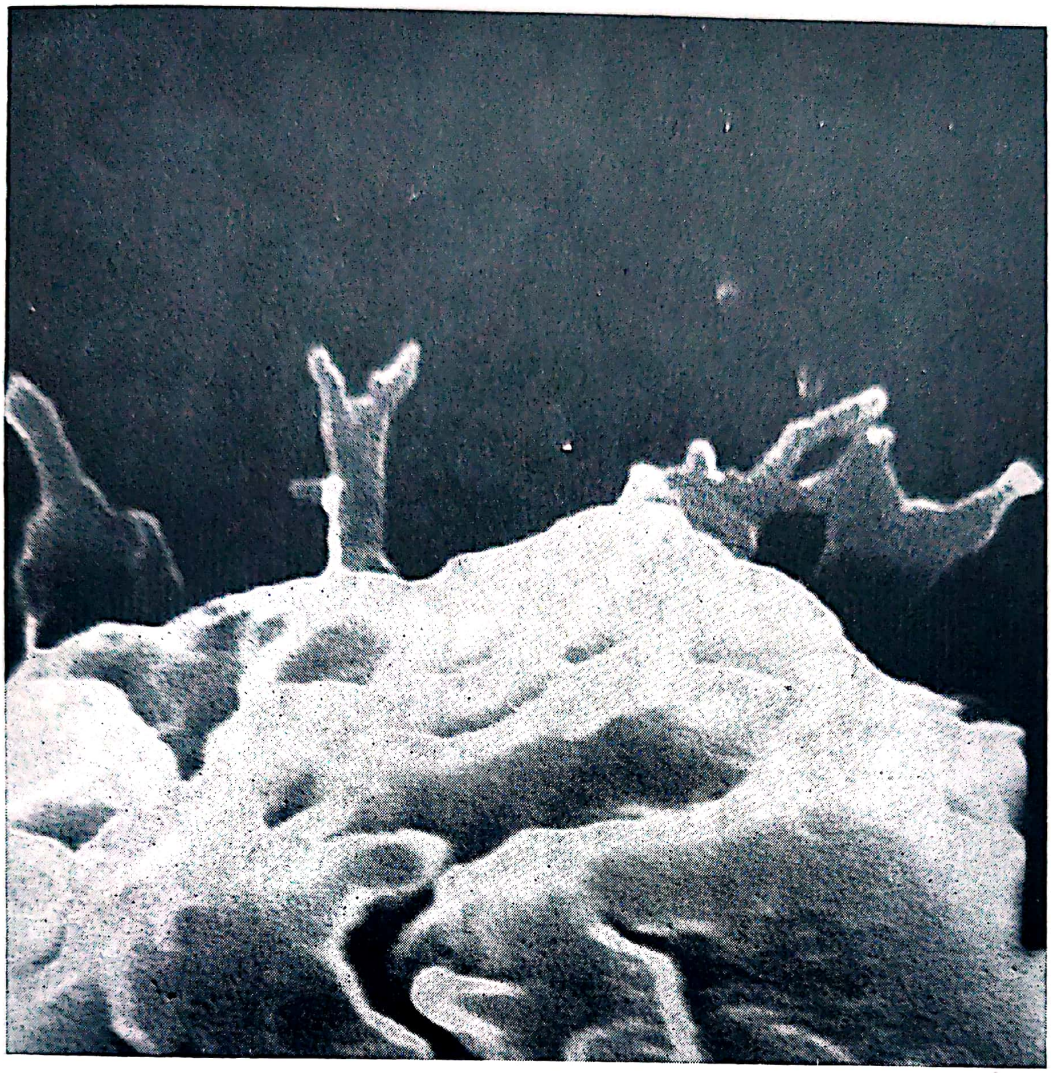


Fig. III-IV/35 x 93 000 Sînge periferic pasăre — Limfosarcom citemic. Detalii de manşonizare a microvililor.

Scanned with OKEN Scanner

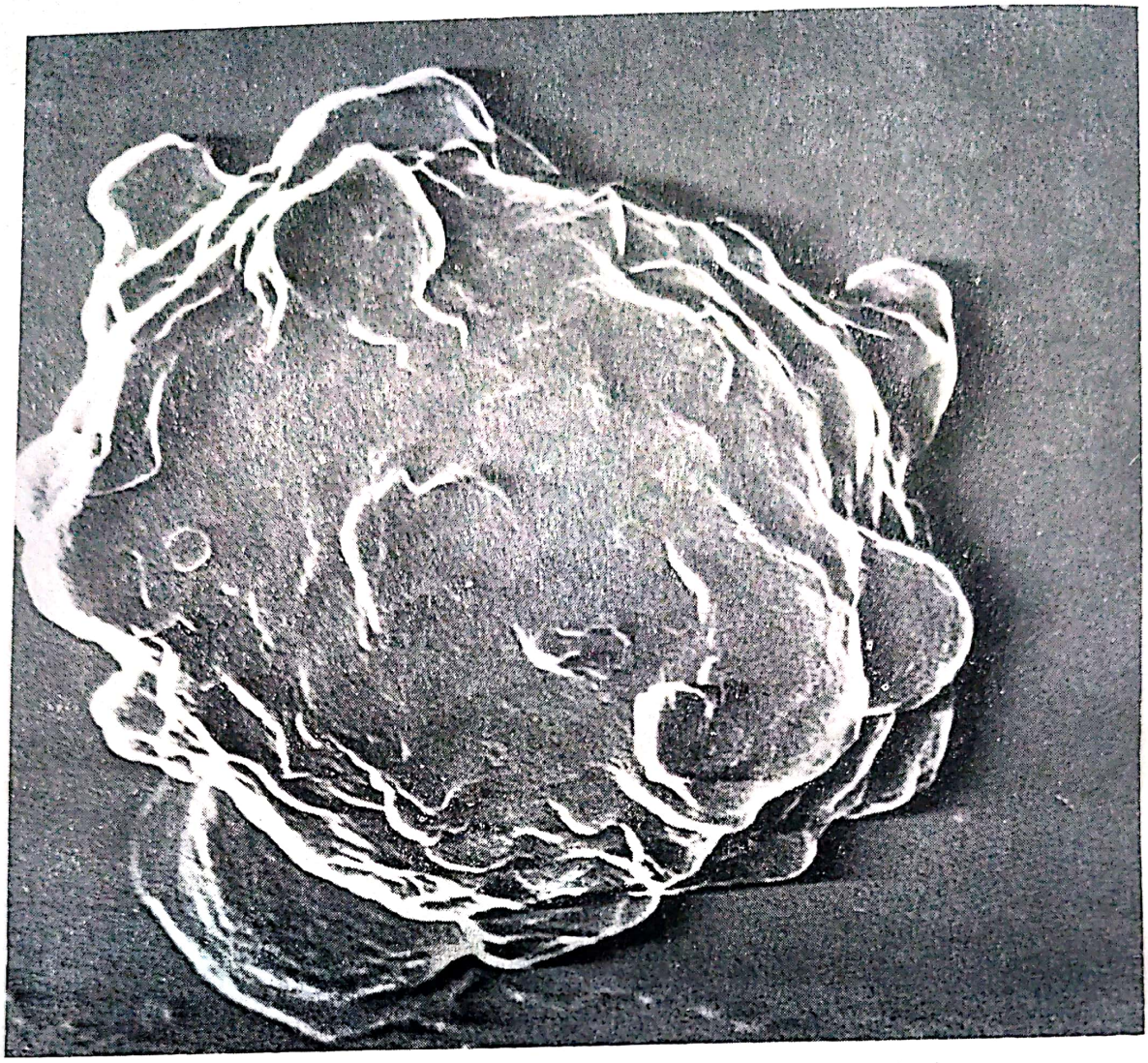


Fig. III-IV/36 x 30 000 Sînge periferic om — Leucoză tumorală limfosarcom — celulă tumorală examinată prin tehnica A.C. Mare grad de atipie.

Om — în cazurile studiate, elementele au fost dominate de proliferările celulare sub formă de noduli (blebsuri) mari (fig. III—IV/39), ce anulează citoarhitectonia suprafeţei celulare. În alte situaţii s-au observat celule cu mantii dispuse în planuri diferite, despărţite de frecvente „coame" cu spaţii între ele, largi de 25 de nanomicroni. Talia acestor celule variază în jur de 50 microni (fig. III—IV 36, 37, 38, 39).

7.2. Leucemia limfoidă cronică (LLC)

În cadrul studiului comparat al limfoamelor maligne, LLC a fost cea mai frecventă formă de manifestare (peste 50 %) atît global cît şi pe fiecare specie în parte. În cadrul acesteia cu ajutorul microscopiei electronice în baleiaj (SEM), am identificat atît limfocite „T" cît şi „B". Frecvenţa tipului „B" este dominantă (circa 90 % cazuri), faţă de tipul „T", care este mai redusă (10 % cazuri).

Scanned with OKEN Scanner

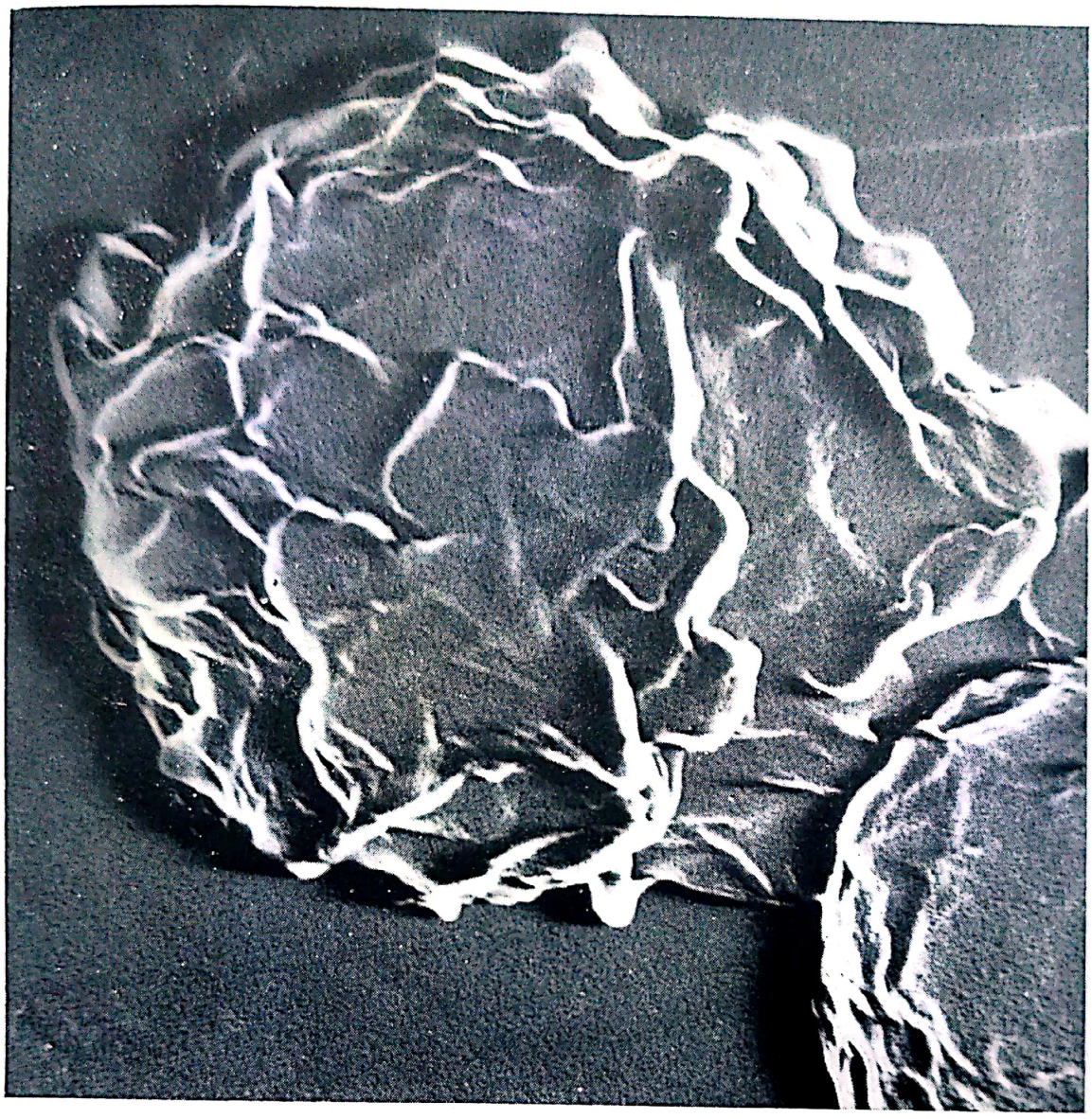


Fig. III-IV/37 x 20 000. Sînge periferic om — Hematosarcom citemic. Celulă sarcomatoasă văzută prin tehnica A.C.

Scanned with OKEN Scanner

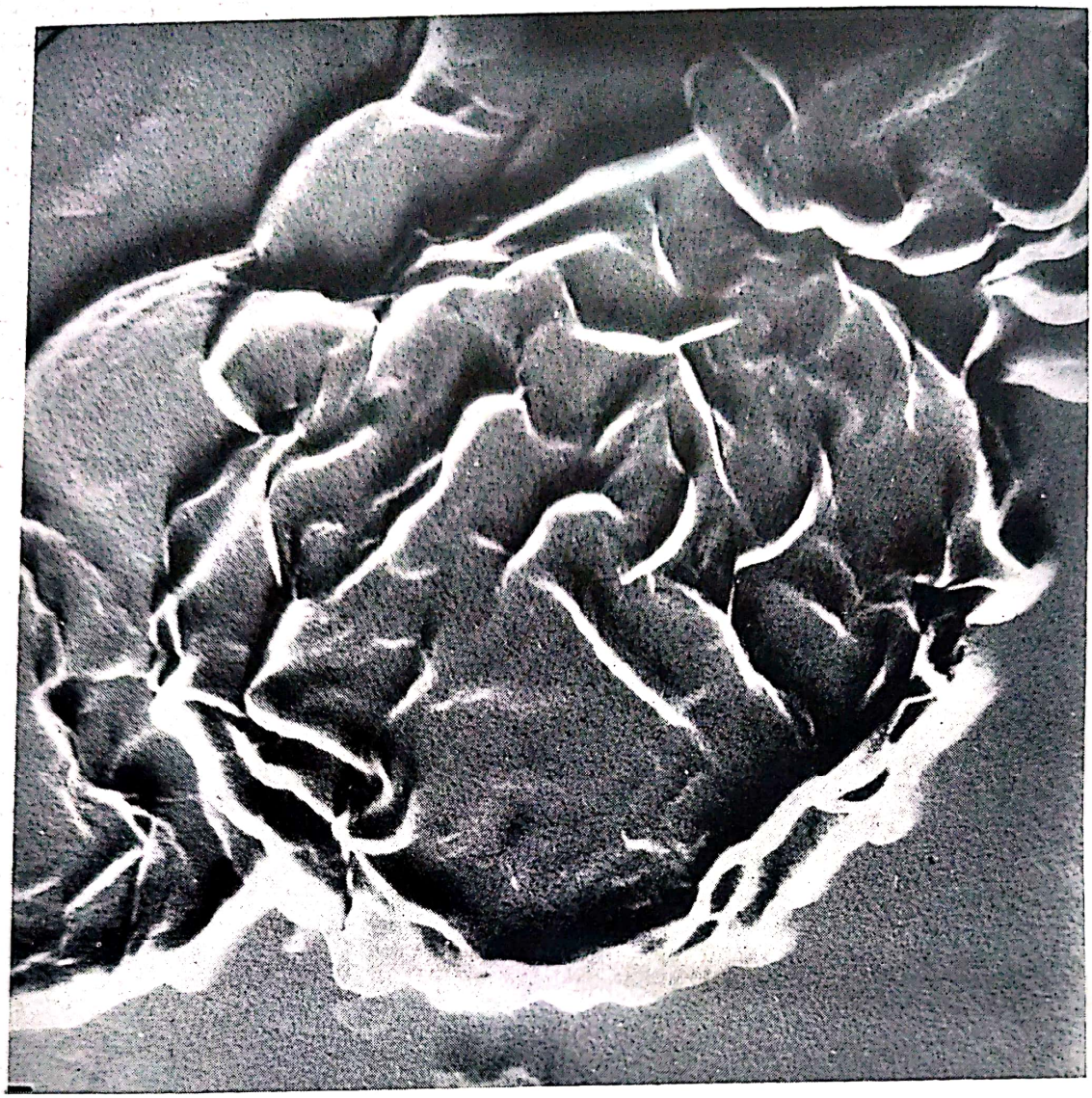


Fig. III/38 x 20 000. Sînge periferic om. Hematosarcom citemic — celulă sarcomatoasă văzută prin tehnica A.C. Atît în fig. prezentă cît şi în cea anterioară prin aplicarea tehnicii A.C. se identifică corecta origine a acestor celule sarcomatoase ca aparţinînd liniei histio-monocitare pe considerentul relevării mantiilor multiple

Scanned with OKEN Scanner

Fig. III-IV/39 x 33 000. Sînge periferic om — Limfosarcom citemic — Prezența nodulilor pe suprafața limfocitului „blebsuri".

Scanned with OKEN Scanner

LLC „T“ — pe ecranul fluorescent al SEM-ului specimenul de sînge periferic apare ca o cultură pură de limfocite de tip „T“ de mărime și formă asemănătoare cu celulele limfocitare „T“ normale. Elementul de distincție îl formează prezența, la multe dintre ele, a unei citoarhitecturi modificate, în sensul măririi exagerate a butonilor, cu confluarea acestora ajungînd pînă la realizarea unor imagini de veritabile „platoșe“ (fig. III—IV 40, 41).

LLC „B“ — este cea mai frecventă formă de leucemie. În specimenele de sînge periferic, pe ecranul fluorescent, apare ca o cultură de celule pure de tip limfocitar „B“ uniforme ca mărime și formă, deci cu evident monomorfism celular. Multe dintre ele prezintă evidente modificări de morfoarhitectură de suprafață celulară vis-a-vis cu normalul, în sensul apariției de celule cu noduli mici (blebsuri), cu îngroșarea hiperplazică-anaplazică a microvililor, care în multe celule confluiază gene-

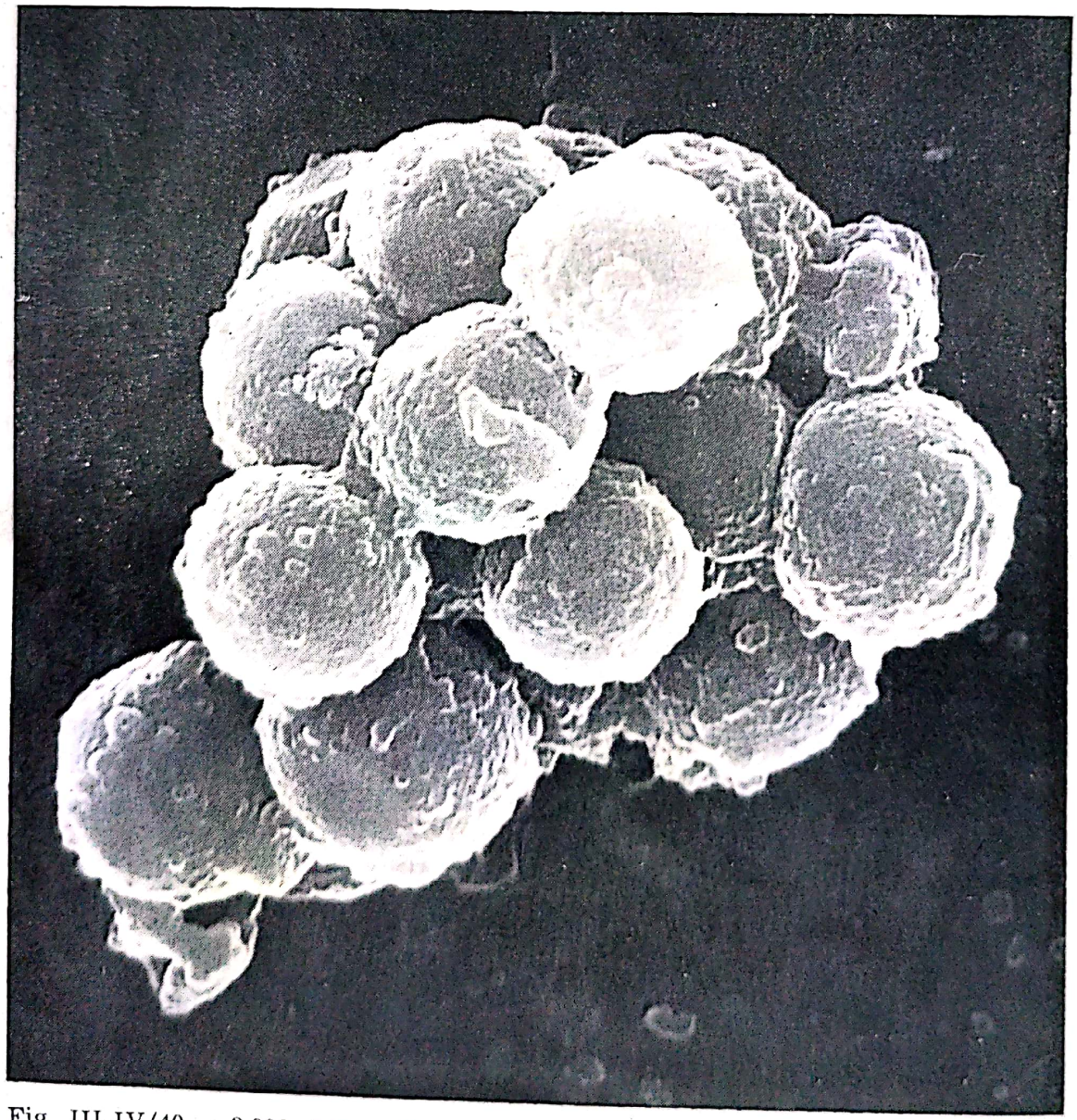


Fig. III-IV/40 x 3 000. Leucocitoconcentrat de bovine. Limfoblaști „T“ atipici. Leucemie limfoblastică „T“ cu același aspect de suprafață.

Scanned with OKEN Scanner

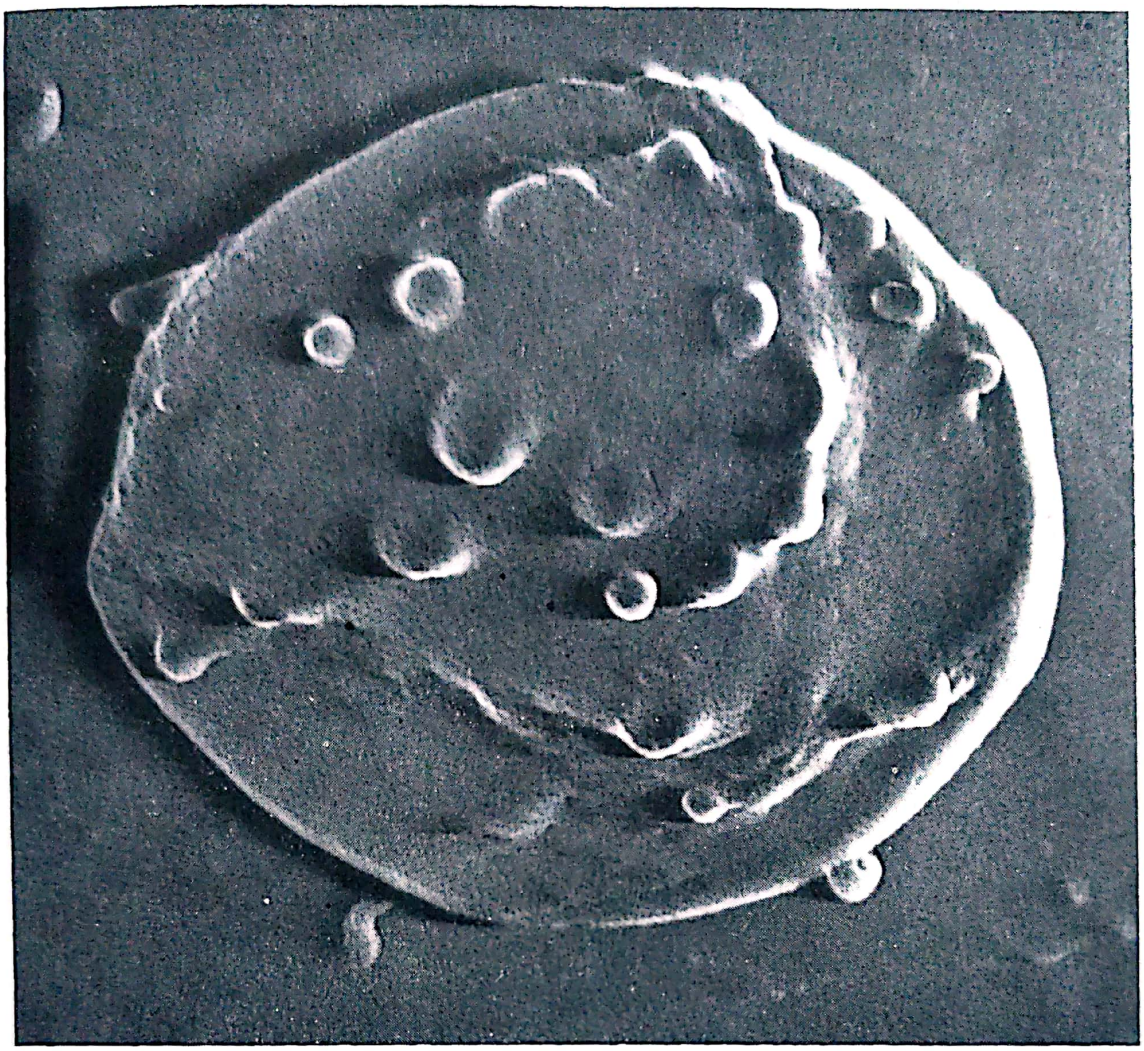


Fig. III-IV/41 x 20 000. Sînge periferic om — Leucemie limfocitară cronică cu celule „T".

Scanned with OKEN Scanner

rînd, fie aspecte de „manşoane groase“, fie de „platoşe“. În cadrul acestei forme de leucemie s-au găsit variaţii apreciabile în seria animală. (fig. III—IV 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

7.3. Leucemia limfoidă acută (LLA)

Reprezintă o formă mai rară a leucemiei care se diferenţiază cu ajutorul microscopului electronic în baleiaj (SEM) după cele 2 forme celulare LLA „T“ şi LLA „B“.

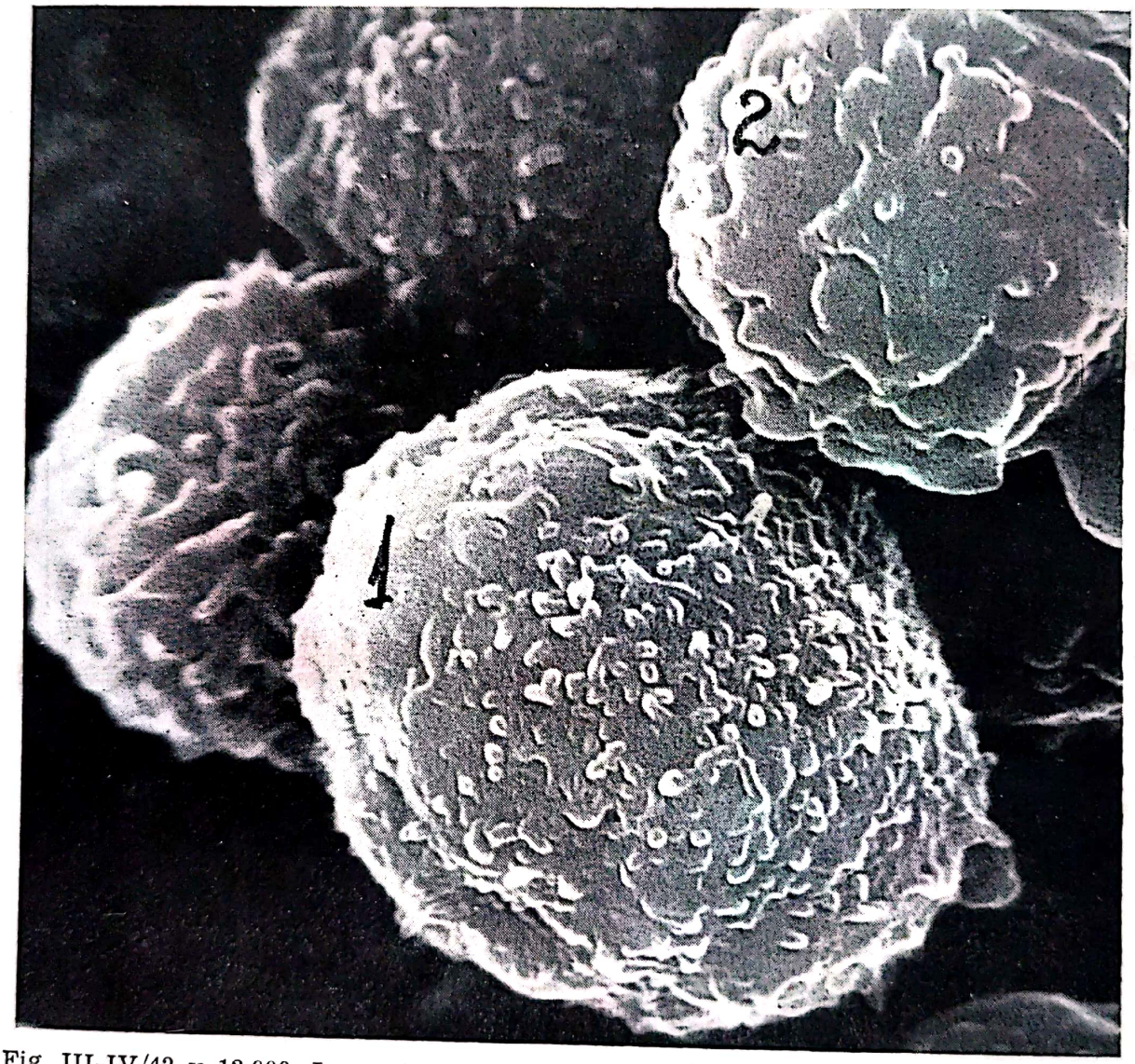


Fig. III-IV/42 x 12 000. Leucocitoconcentrat de porc. Leucemie limfoidă cronică „B“. Un limfoblast „B“ (1) alături de un limfocit „B“ (2) care prezintă o puternică anaplazie a microvililor transformaţi în veritabile platoşe.

LLA „T“ — elementul de distincţie la SEM, pe ecranul fluorescent, faţă de LLC pe un specimen de sînge periferic, este prezenţa monomorfă de celule limfocitare „T“ dar de mărime *quasi dublă*, 20—28 microni faţă de celulele din LLC. În rest modificările de suprafaţă celulară sînt similare cu cele din LLC. (fig. III—IV 53).

Scanned with OKEN Scanner

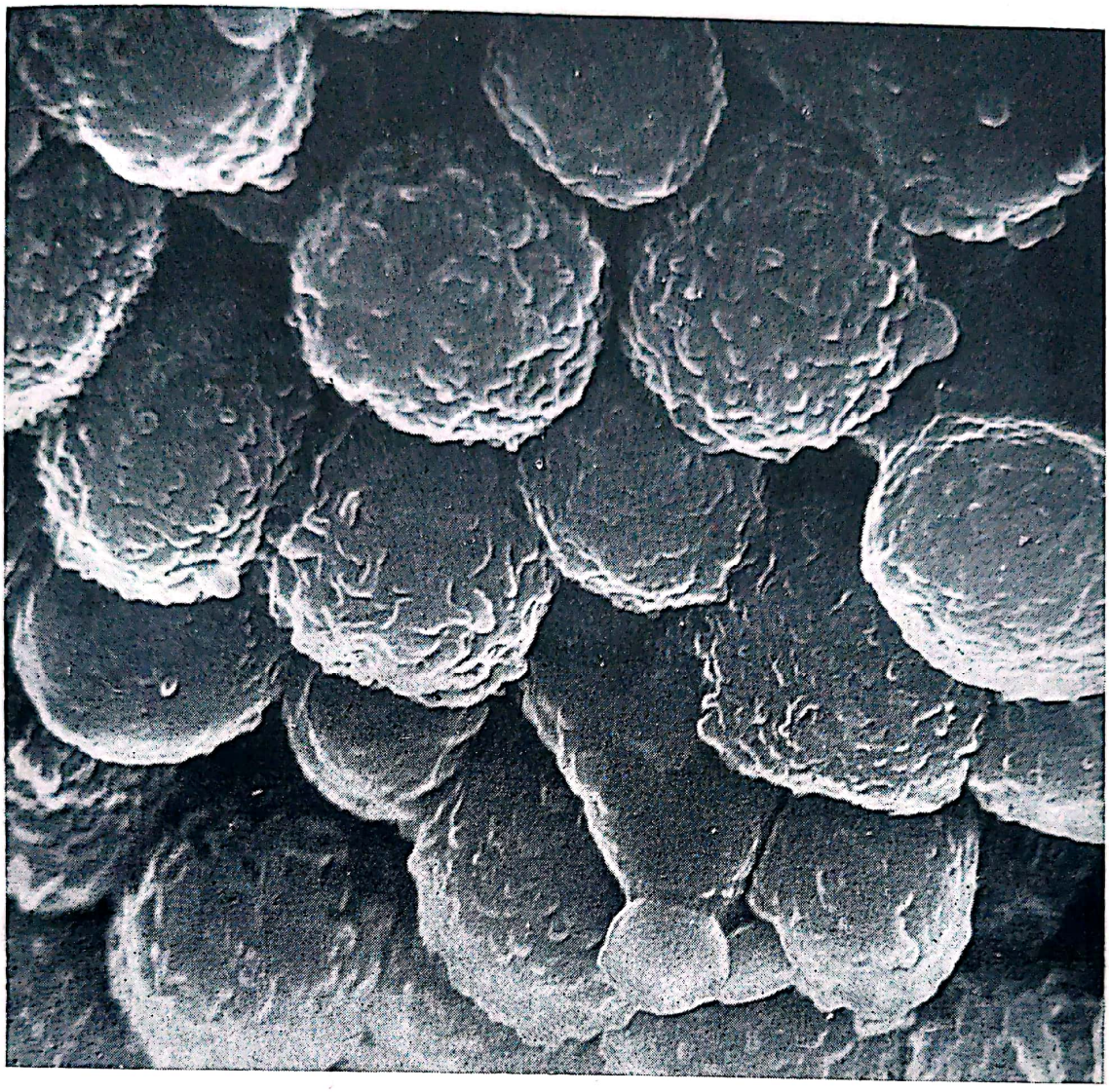


Fig. III-IV/43 x 3 500. Leucocitoconcentrat de cal — Anemie infecţioasă cronică. Cultură quasi pură de limfocite de tip „B“ atipice.

Scanned with OKEN Scanner

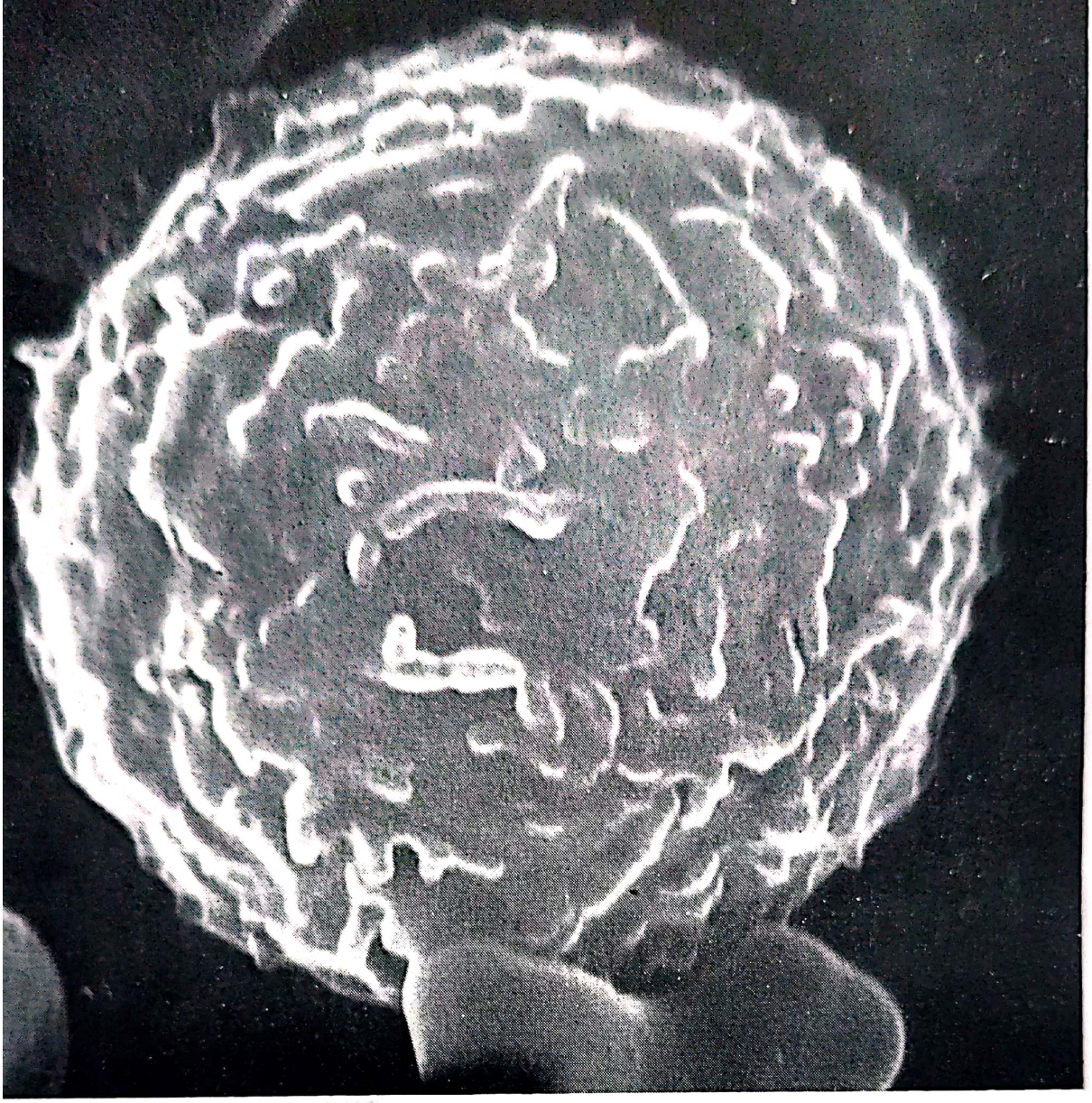


Fig. III-IV/44 x 20 000. Leucocitoconcentrat de oaie. Leucemia limfoidă cronică. Un limfocit „B" atipic care are o puternică îngroşare a microvililor.

Scanned with OKEN Scanner

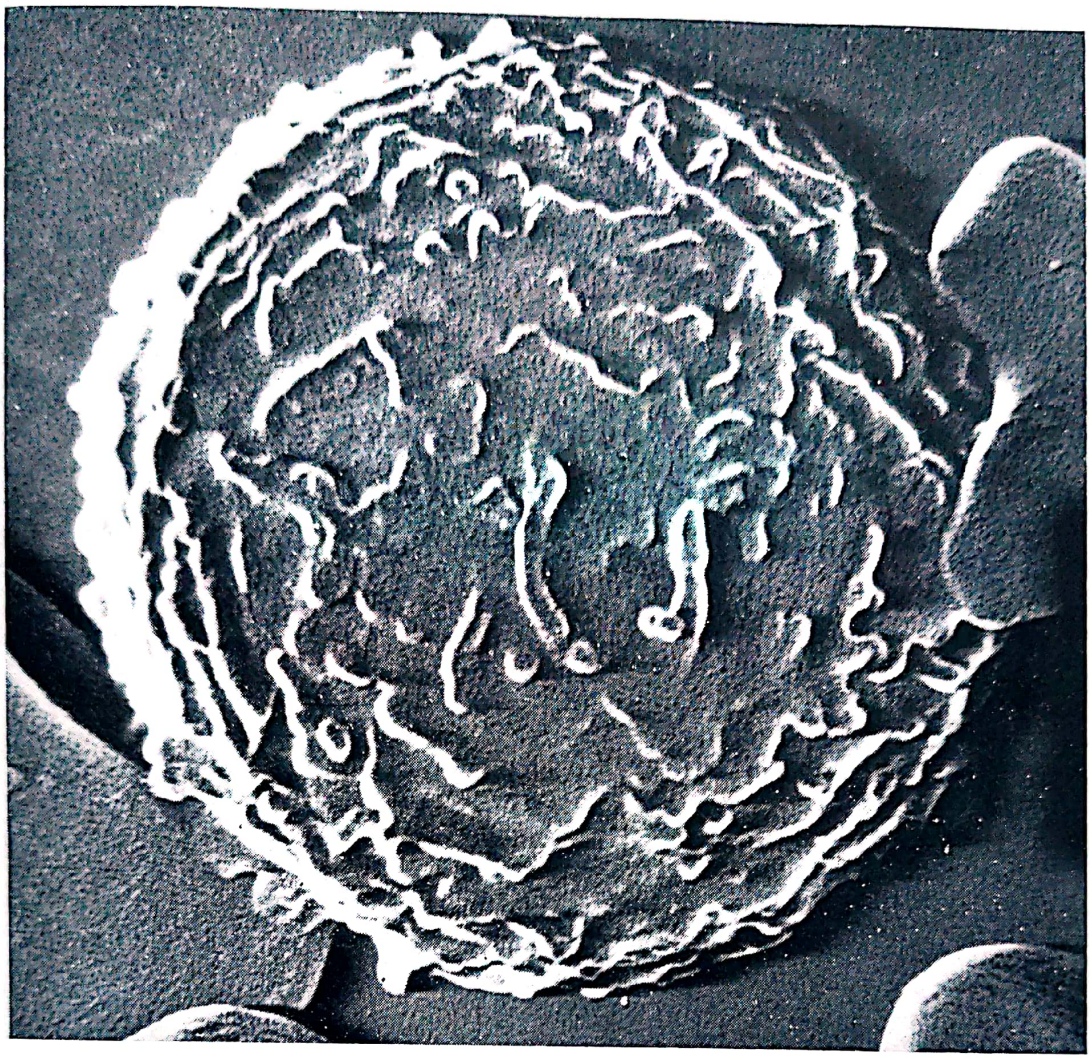


Fig. III-IV/45 x 20 000. Aceeași celulă dar examinată în tehnica A.C. Toate detaliile de pe suprafața celulară se observă mult mai clar.

Scanned with OKEN Scanner

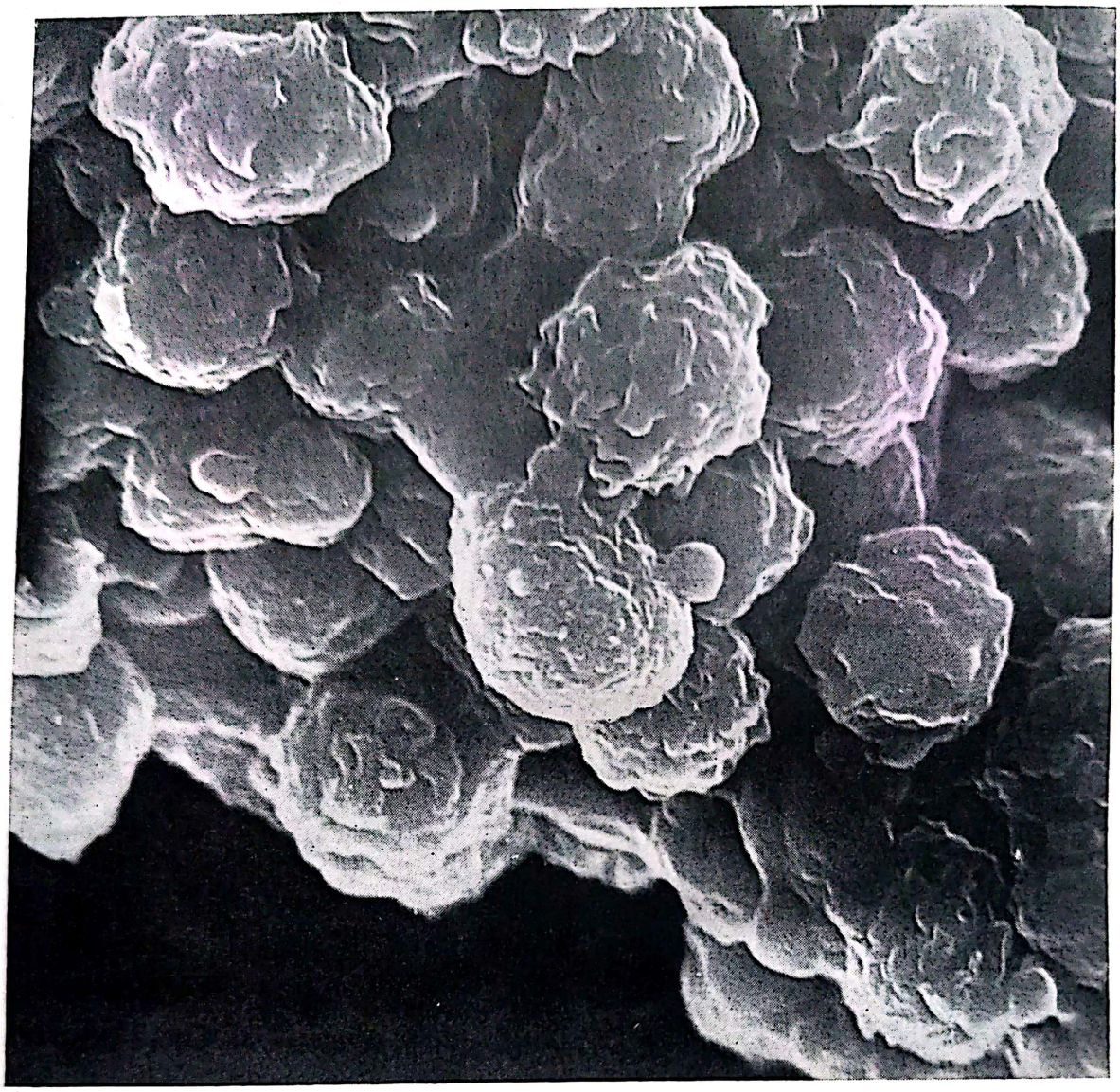


Fig. III-IV/46 x 2 000 Leucocitoconcentrat — Leucoză bovină cu celule „B". Se identifică toate felurile de atipii, adică celule cu platoșe, cu blebsuri, cu mantii (ruffles) etc.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. III-IV/47 x 50 000. Leucocitoconcentrat — Leucoză bovină cu celule „B". Se identifică o confluare a microvililor care inițial au suferit o puternică hiperplazie anaplazică generînd veritabile „manșoane" pe suprafața celulară.

Scanned with OKEN Scanner

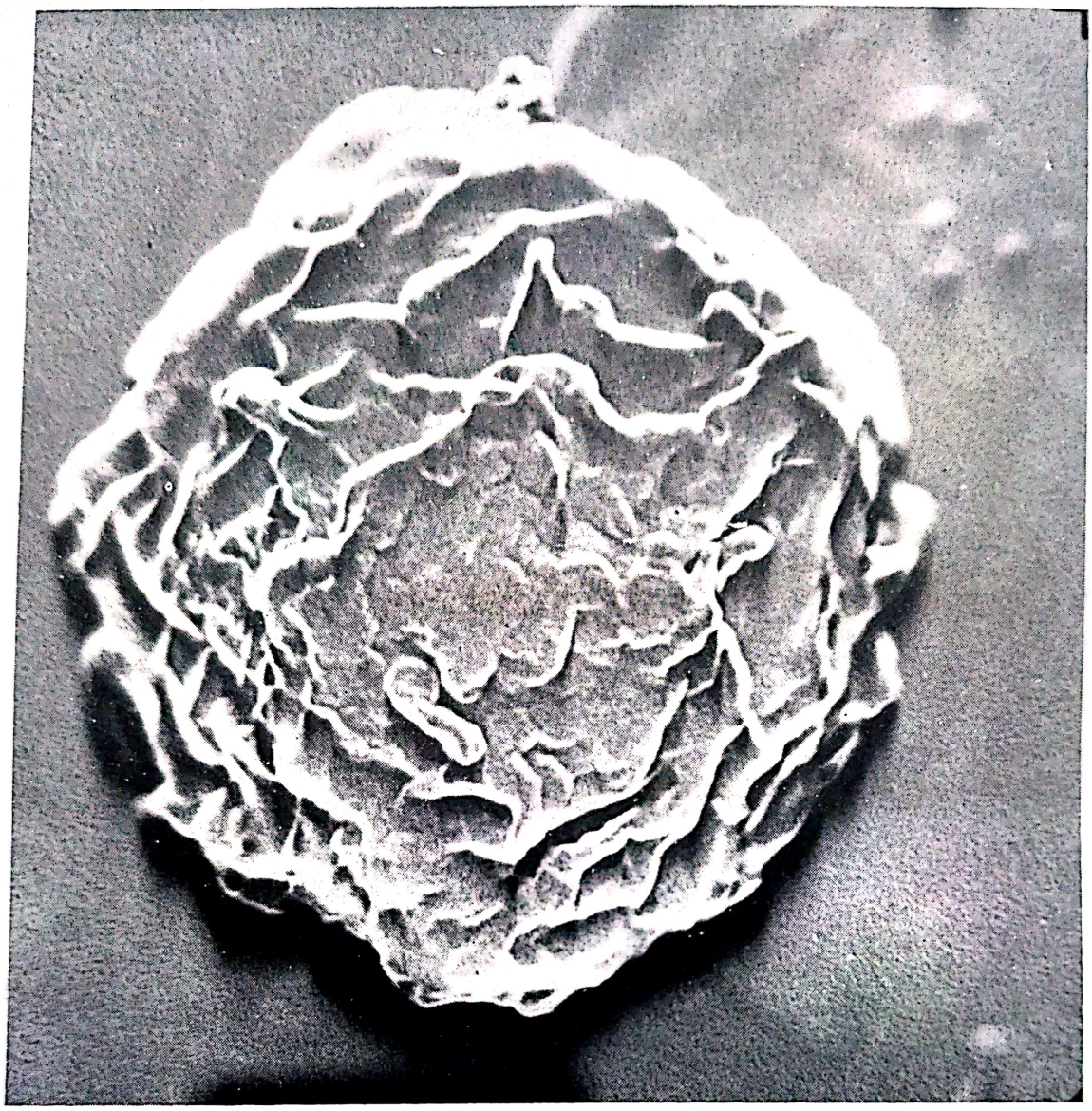


Fig. III-IV/48. Aceeaşi mărime şi acelaşi caz, dar examinat prin tehnica A.C. permite o mai clară imagine a manşonizării microvililor anaplazici.

Scanned with OKEN Scanner

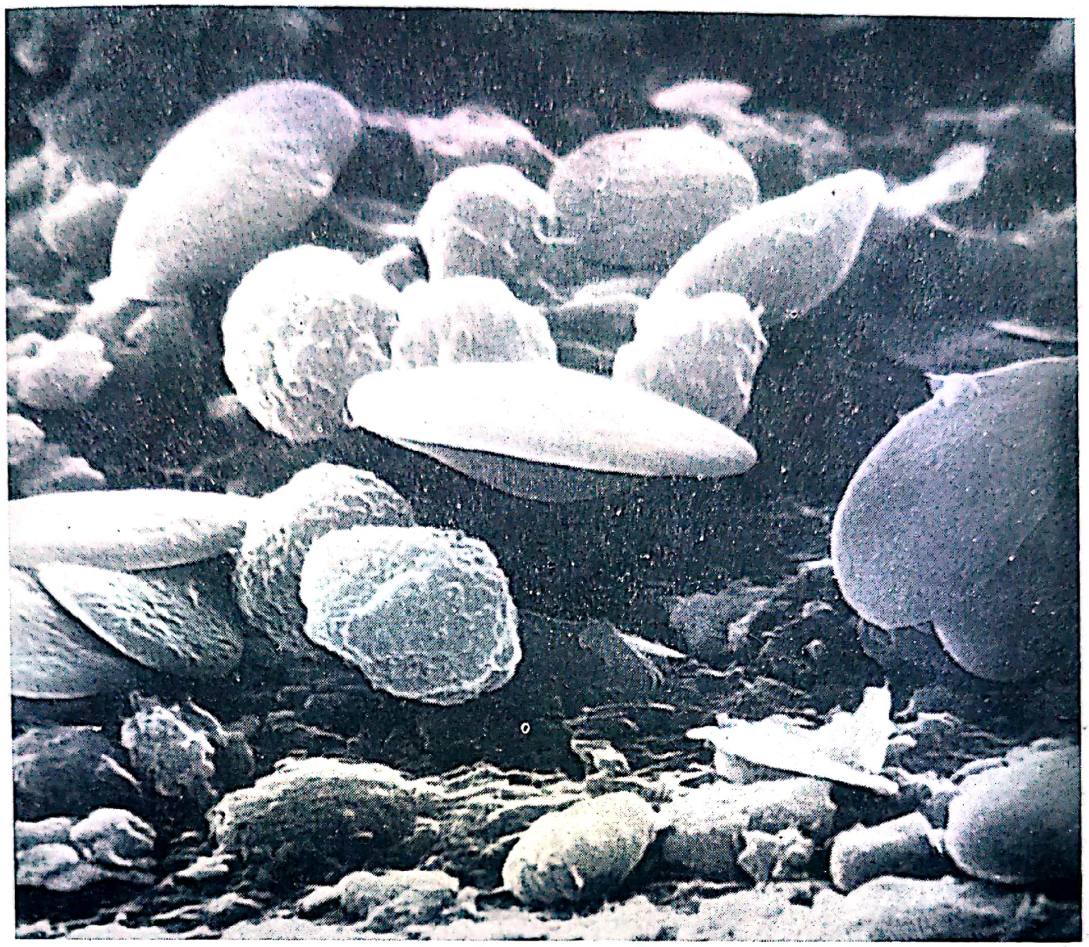


Fig. III-IV/49 x 5 000. Sînge periferic — Leucoză aviară de tip limfocitar „B". LLC

Scanned with OKEN Scanner

Fig. III-IV/50 x 22 500 — Sînge periferic — Leucoză limfoidă aviară — acelaşi proces în suprafaţă ca şi cel din cazul leucozei bovine (fig. 47) manşonizarea microvililor hipertrofiaţi anaplazic. LLC.

Scanned with OKEN Scanner

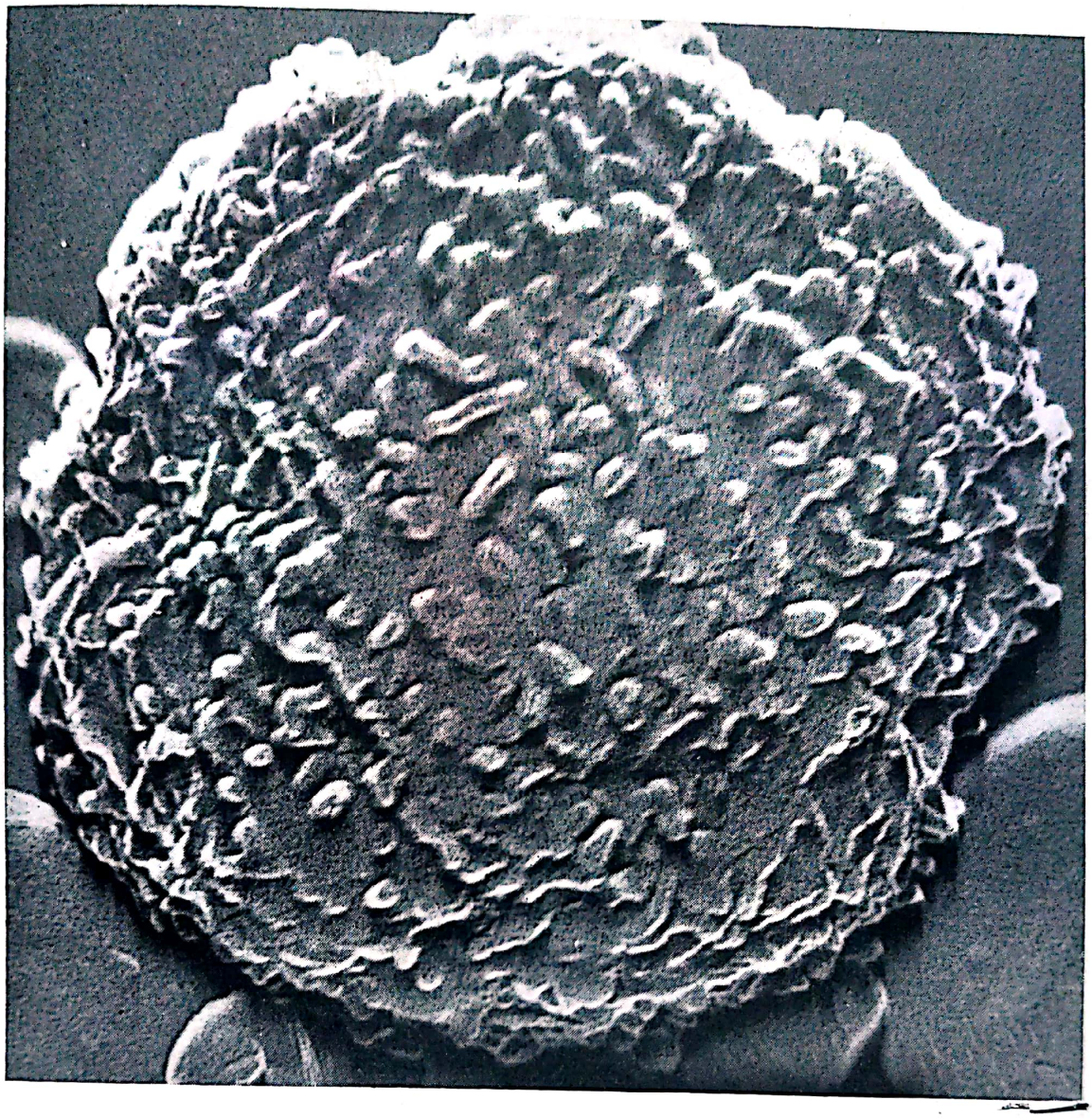


Fig. III-IV/51. x 40 000. Leucocitoconcentrat de om — Leucemie limfoidă cronică. Examen prin tehnica A.C. Prezența unui limfocit „B“ avînd microvilii proliferați dar bine individualizați. LLC.

Scanned with OKEN Scanner

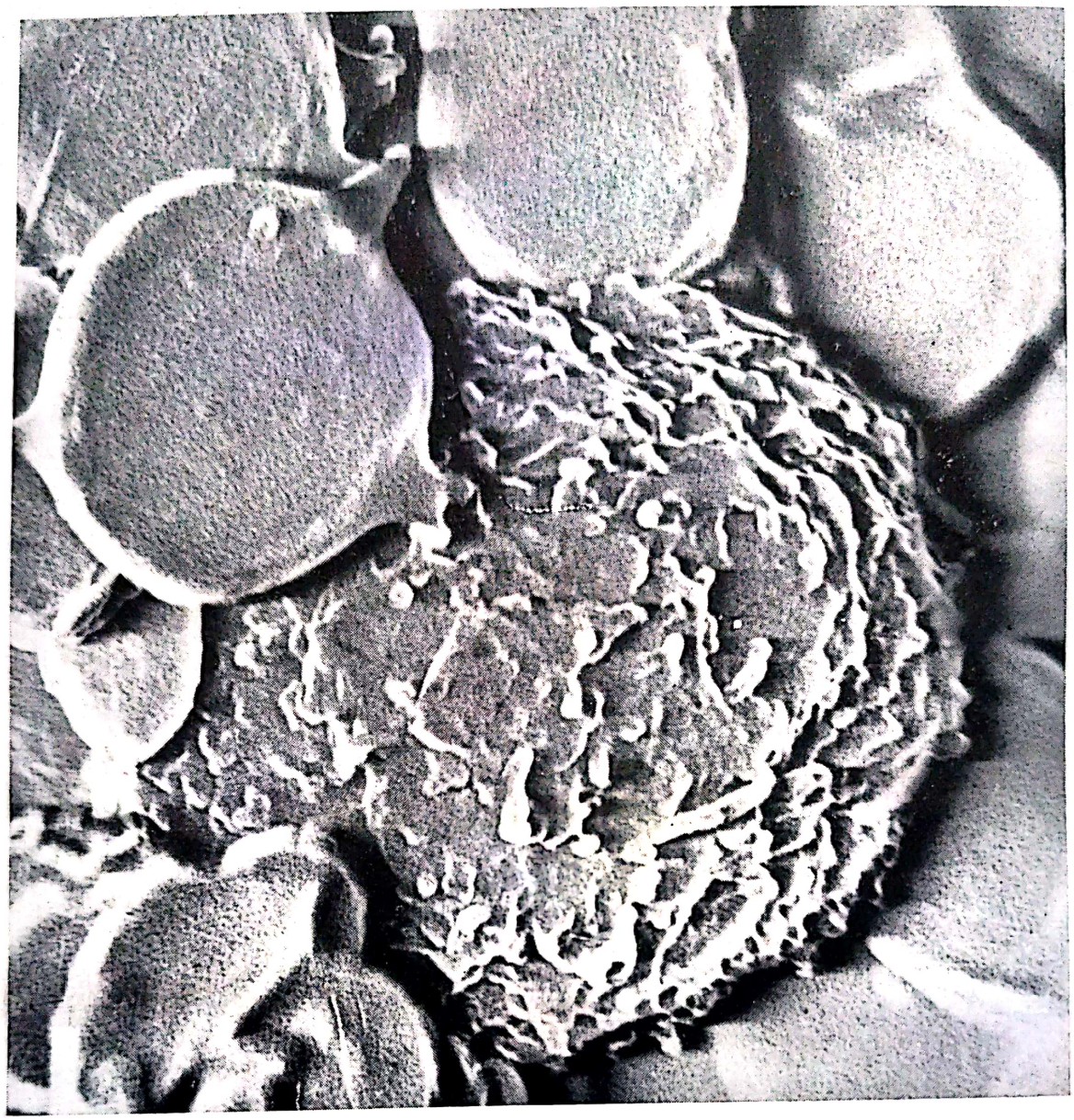


Fig. III-IV/52 x 30 000. Sînge periferic om — Leucemie limfoidă cronică. Imaginea unui limfocit „B“ — Tehnica de examinare prin A.C. LLC

Scanned with OKEN Scanner

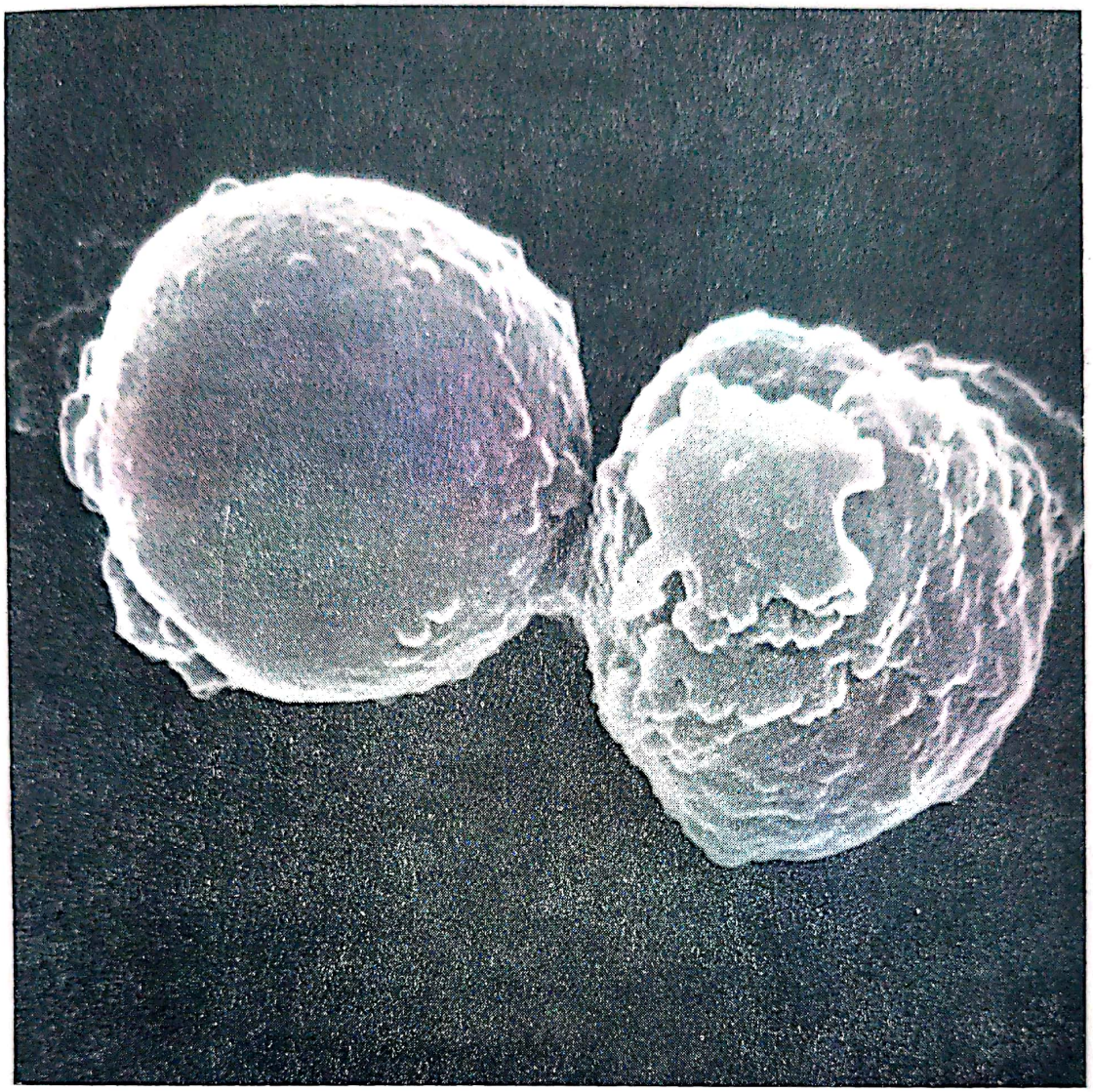


Fig. III-IV/53 x 7 000. Limfoblaşti „T" atipic (bovine). Leucemie acută limfoblastică „T". Leucocitoconcentrat. Îngroşarea exagerată a butonilor cu mărimea lor în suprafaţă. LLA.

Scanned with OKEN Scanner

LLA „B" — se deosebește în SEM pe ecranul fluorescent față de LLC pe un specimen de sînge periferic, prin aspectul celular monomorf cu celule limfocitare „B" de mărime mult mai mare decît celulele prin LLC (22—26 microni). Modificările de suprafață celulară nu se diferențiază față de cele din LLC (fig. III 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 60 bis).

7.4. Leucemia paralimfoblastică (LPL)

Este o formă de leucemie particulară specifică numai porcului care se exprimă citologic, pe ecranul fluorescent al SEM-ului, ca o proliferare monomorfă de celule de tip „T", dar de o mărime neobișnuit de mare,

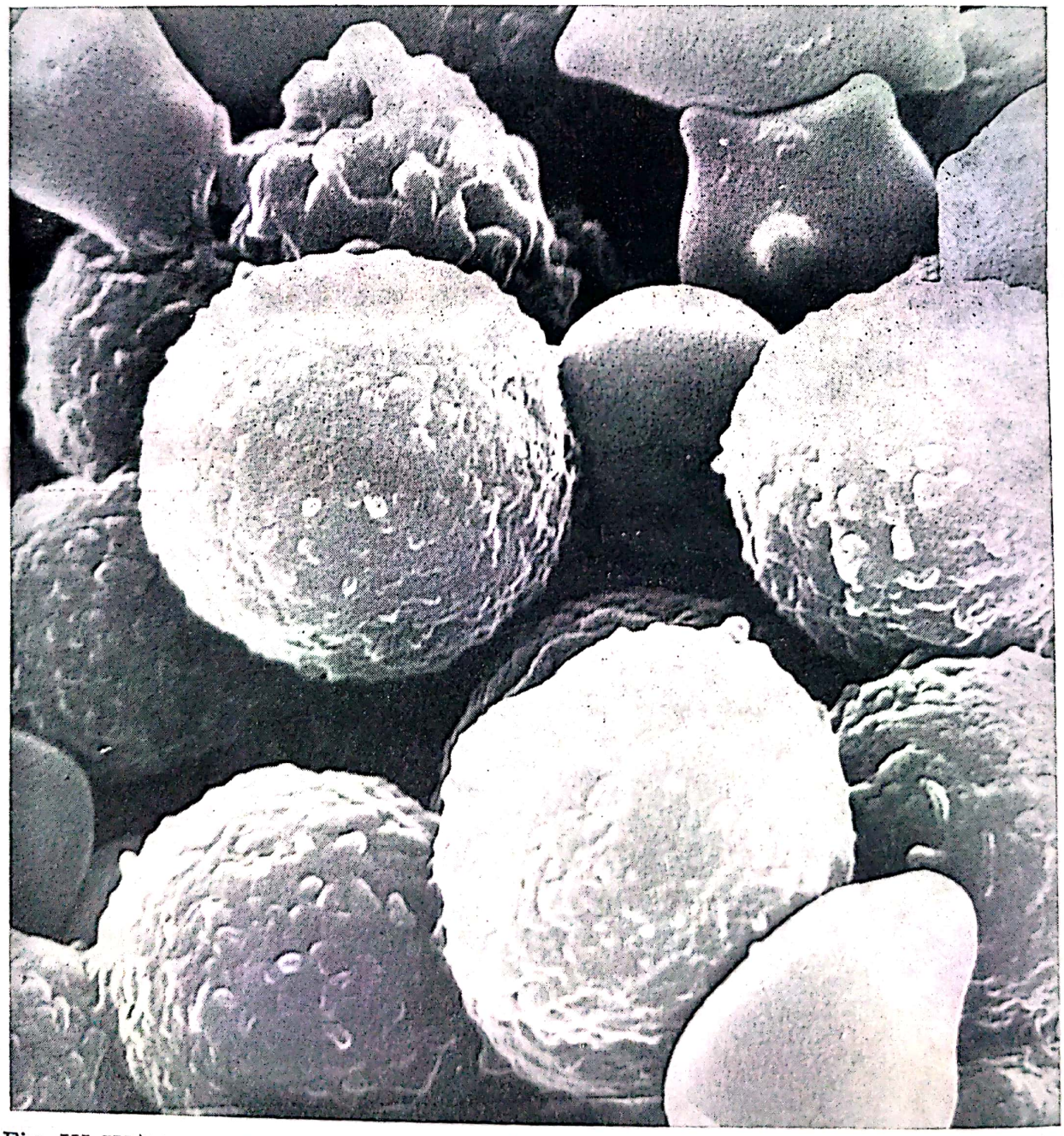


Fig. III-IV/54 x 15 000. Leucocitoconcentrat de om — Leucemie limfoidă acută — Prezența totalitară a limfoblaștilor atipici „B". LLA

Scanned with OKEN Scanner

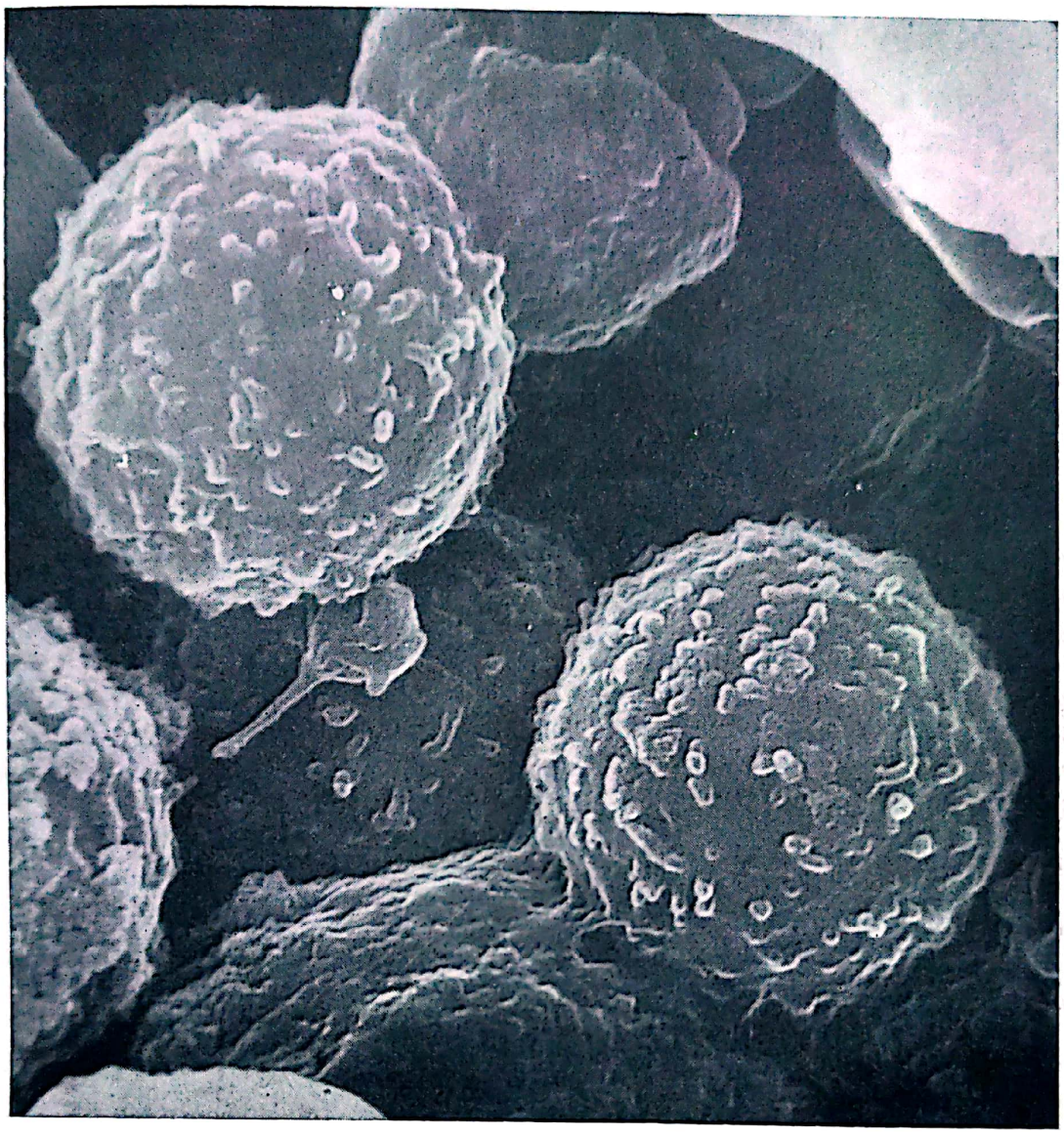


Fig. III-IV/55 x 5 500. Leucocitoconcentrat de cal — Anemia infecţioasă acută. Prezenţa limfoblaştilor „B" atipici. LLA.

Scanned with OKEN Scanner

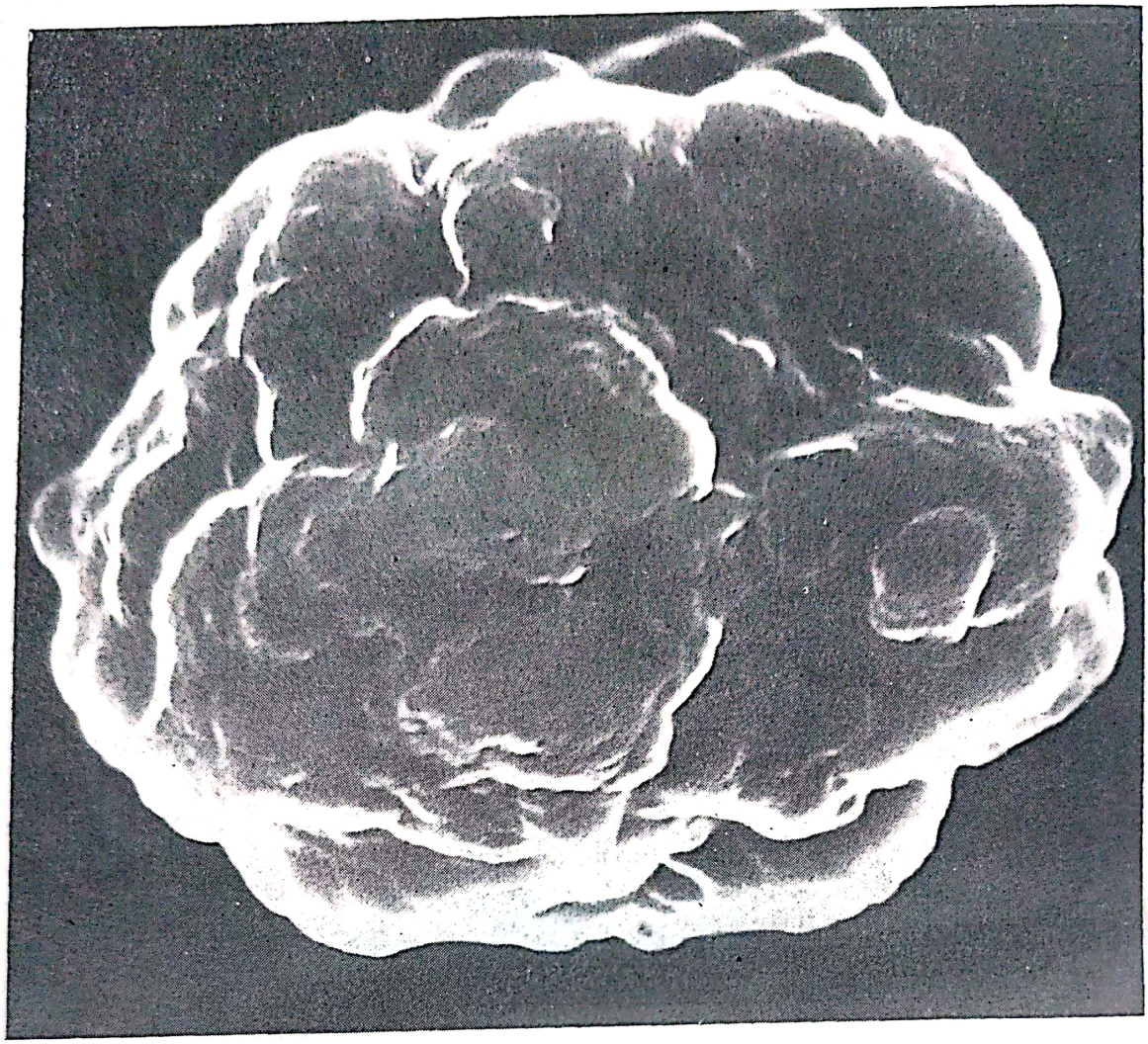


Fig. III-IV/56 x 15 000. Limfoblast tumoral cu multiplii noduli (bleps) LLA. La om.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. III-IV/57 x 15 000. Același aspect în contrast înalt (A.C.).

Scanned with OKEN Scanner

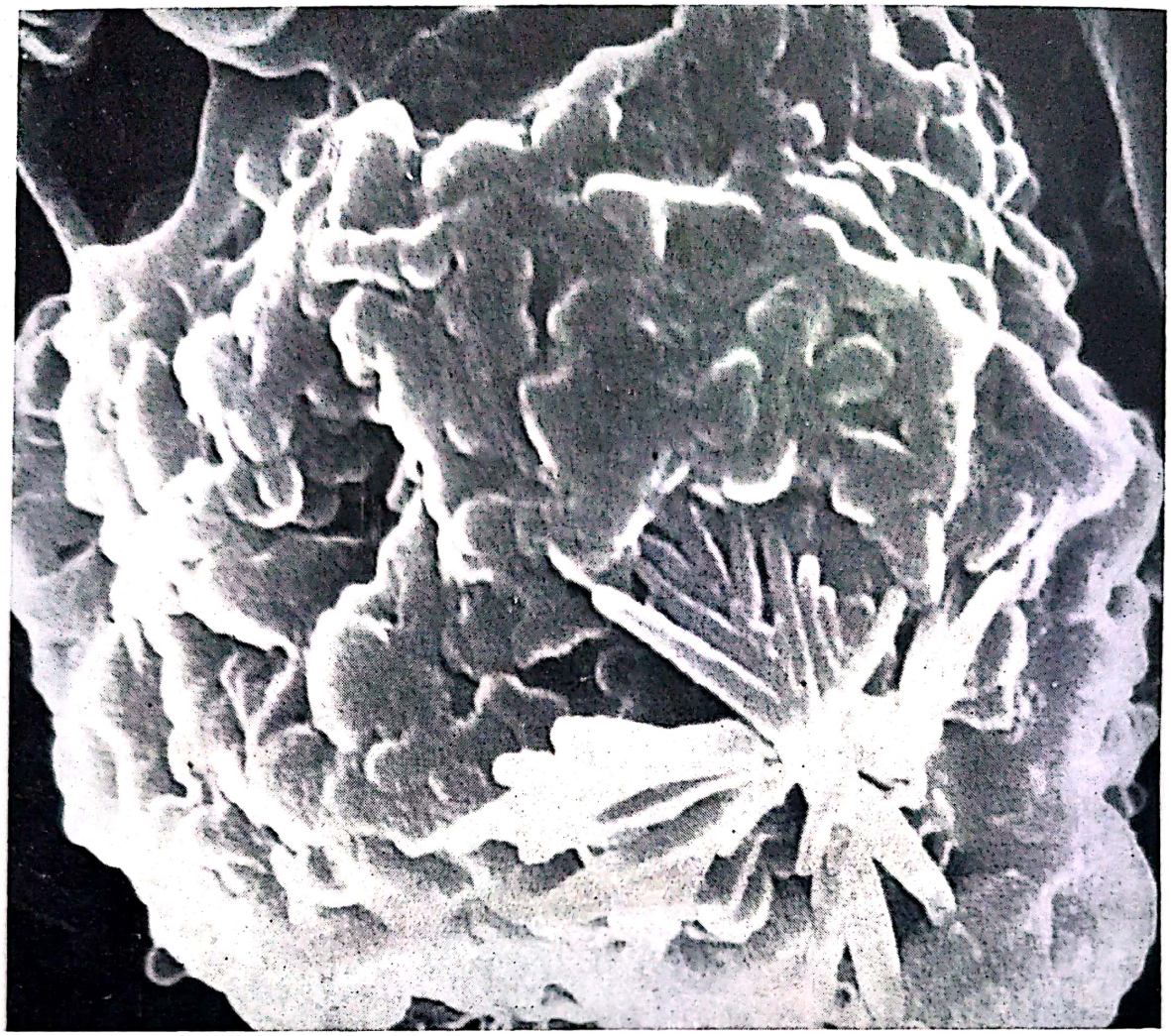


Fig. III-IV/58 x 40 000. Microvili manşonizaţi limfoblast „B“ LLA bovine.

Scanned with OKEN Scanner

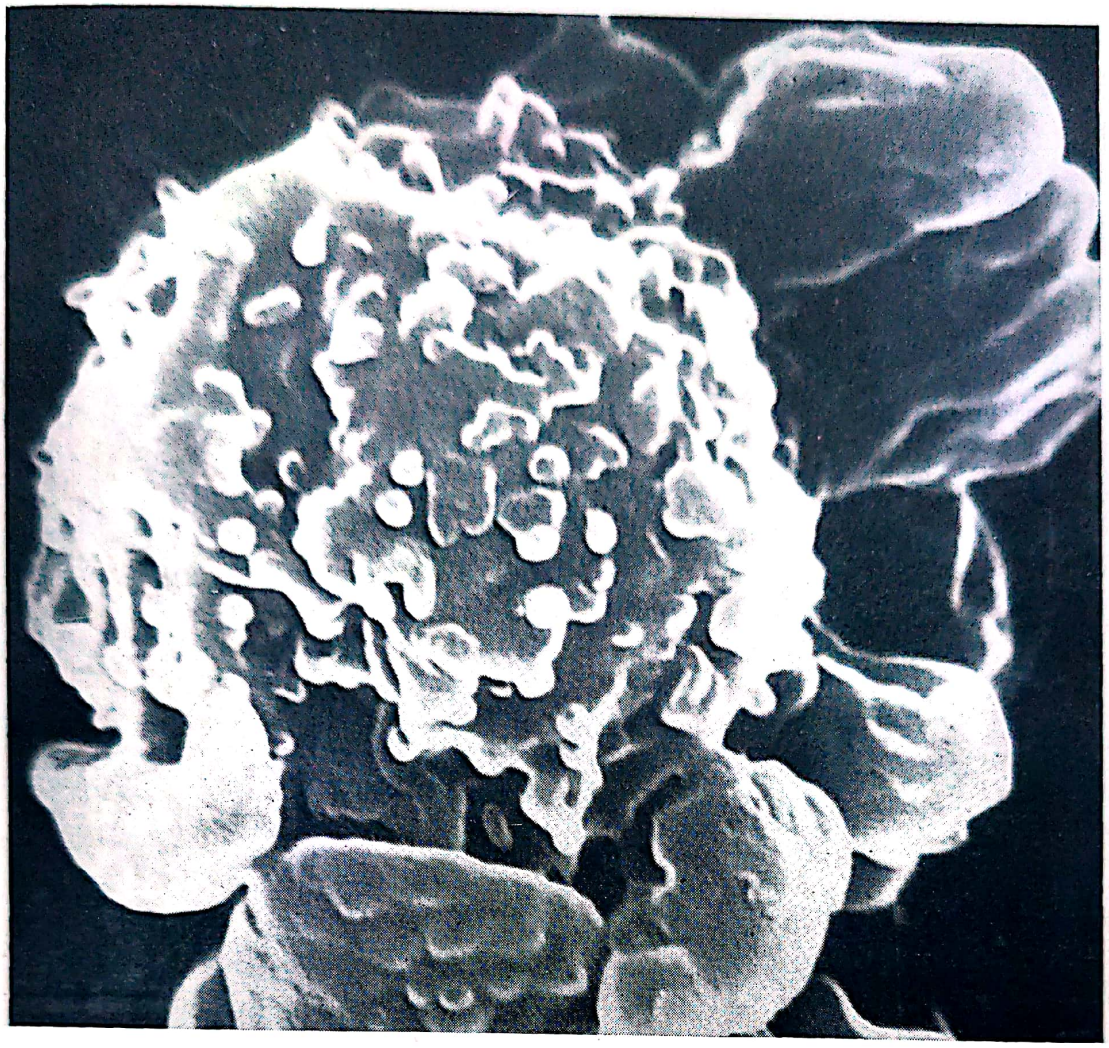


Fig. III-IV/59 x 15 000. Rozeta E.A.C. în LLA bovine.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. III-IV/60 x 7 000. Sînge periferic LLA — bovine. Limfoblaşti tip „B".

Scanned with OKEN Scanner

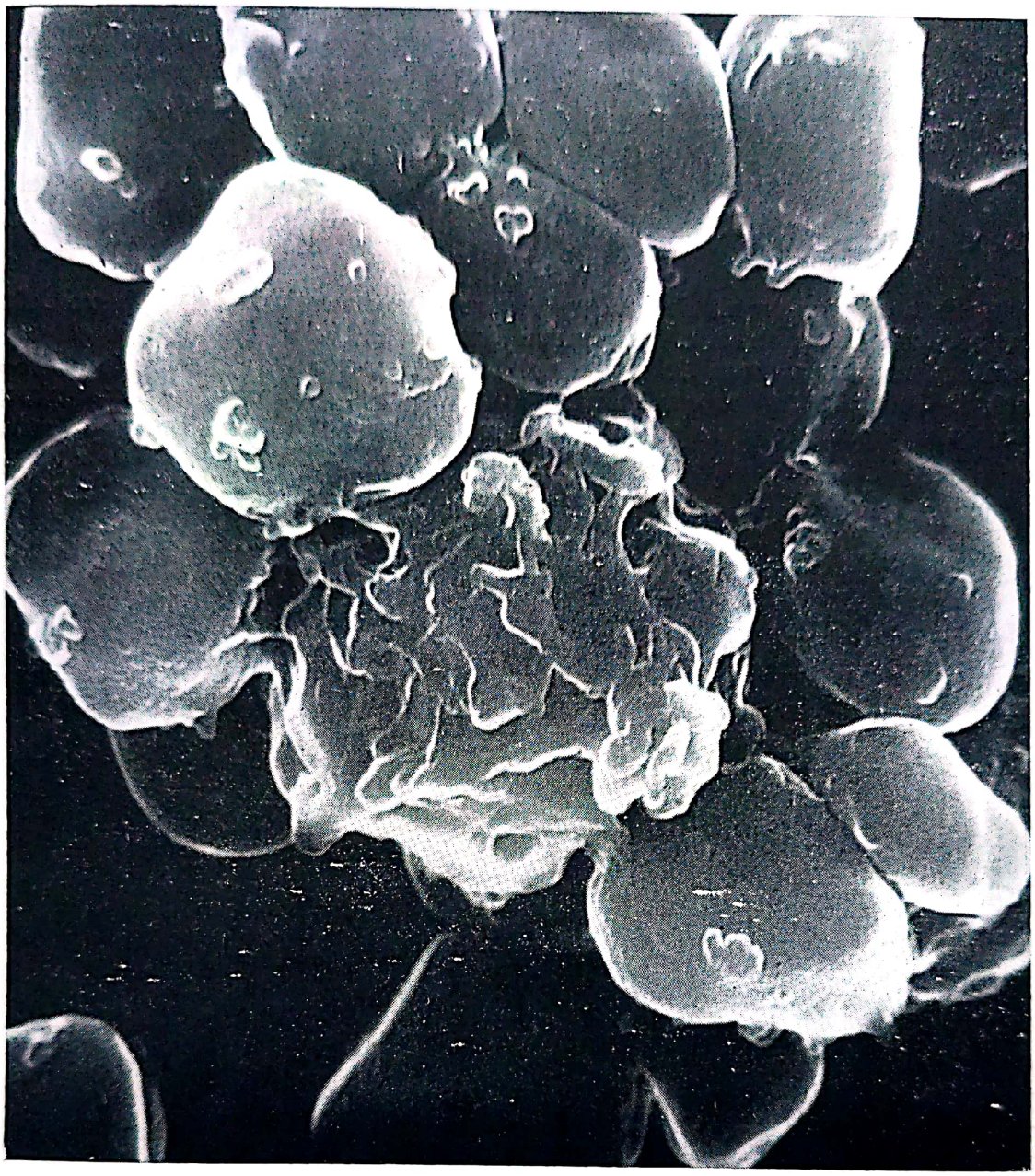


Fig. III-IV/60 x 15 000. Tehnica de rozetare E.A.C. în caz de leucoză bovină. LLA.

Scanned with OKEN Scanner

de circa 30—40 microni. Aceste celule de tip „T" sînt limfoblastice. Faţă de LLA „T" acesta este elementul de distincţie, caracteristic speciei, deoarece structurile de suprafaţă celulară sînt *quasi identice* cu cele din LLA „T" (fig. III—IV 61, 62).

7.5. Leucemia monocitară (LM)

Este o formă rară de leucemie care se caracterizează printr-un relativ monomorfism celular. Pe ecranul fluorescent al SEM-ului, în situaţia studierii unui specimen de sînge periferic, elementul de distincţie netă — faţă de formele de leucemii limfoproliferative — îl constituie *caracterul quasipatognomonic* al aspectului morfostructurii tridimensionale al celu-

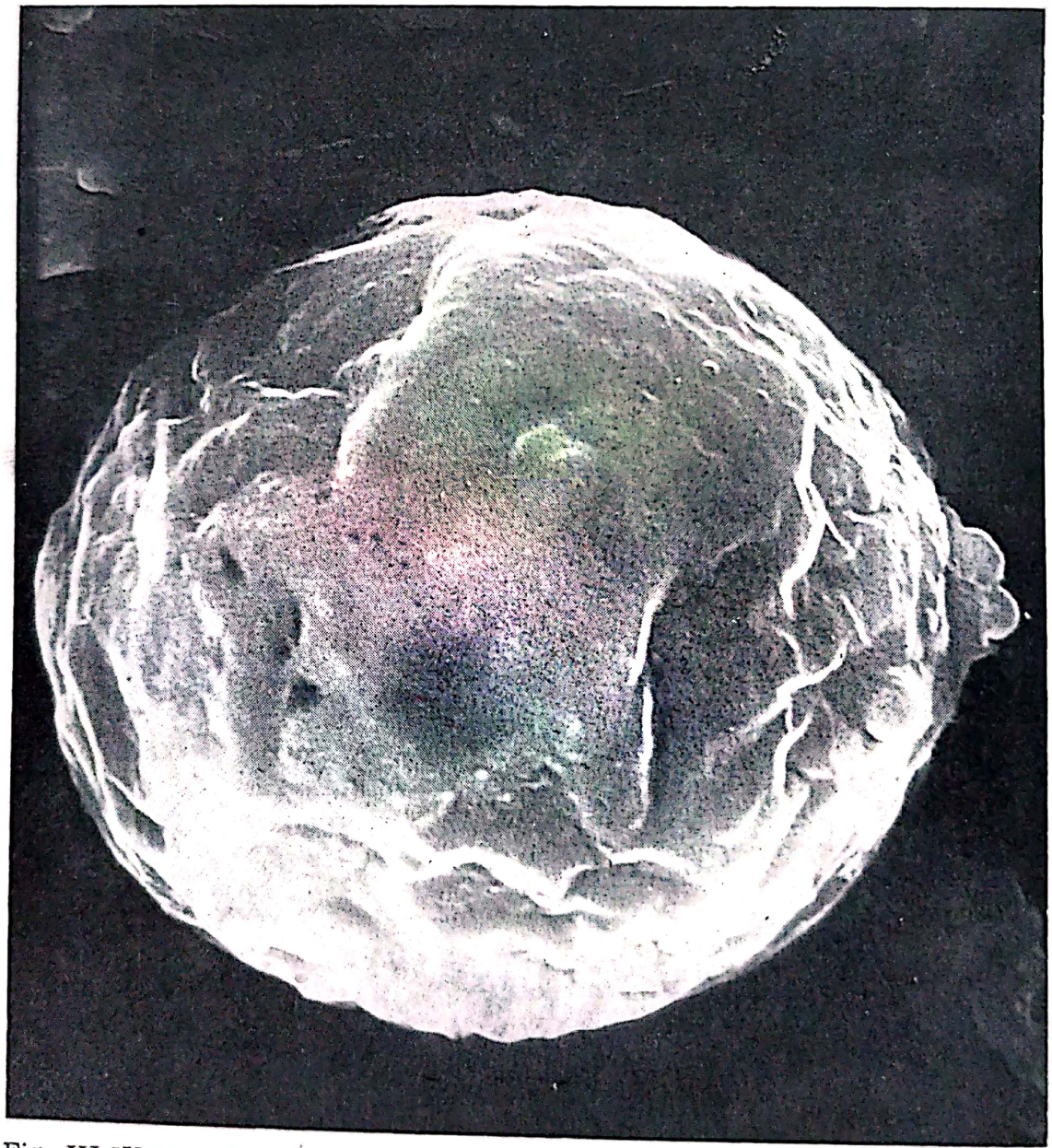


Fig. III-IV/61 x 9 500. Medulogramă porc pestă. Leucemie paralimfoblastică. Pare a fi o celulă limfoblastică de tip „T" modificată parţial.

Scanned with OKEN Scanner

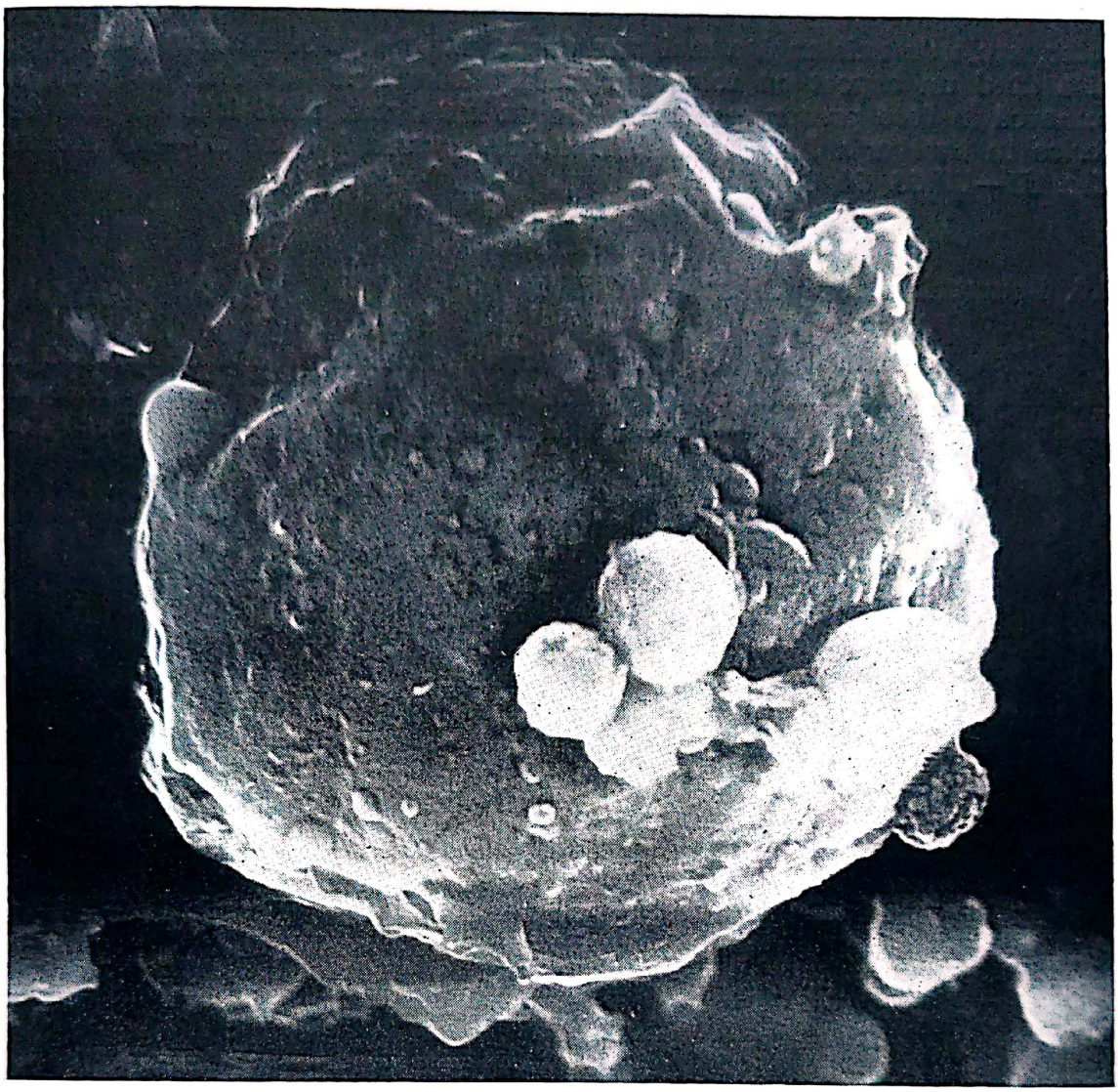


Fig. III-IV/62 x 9 500. Medulogramă porc pestă. Leucemie paralimfoblastică.

Scanned with OKEN Scanner

lelor, acela de existență a mai multor „mantii" care se răsfrîng una peste alta dînd un aspect cu totul particular sistemului celular. În plus, se remarcă *in toto* prezența unor celule cu mult mai mari față de cele descrise în categoria LLC sau LLA. Acestea variază între 20—40 microni (fig. III—IV 63, 64, 65, 66).

7.6. Leucemia histio-monocitară (LHM)

Este o formă mai rară de leucemie care se aseamănă cu LM în privința mărimii celulelor și a structurii de suprafață. Elementele de distincție — față de LM — pe ecranul fluorescent al SEM-ului, sînt repre-

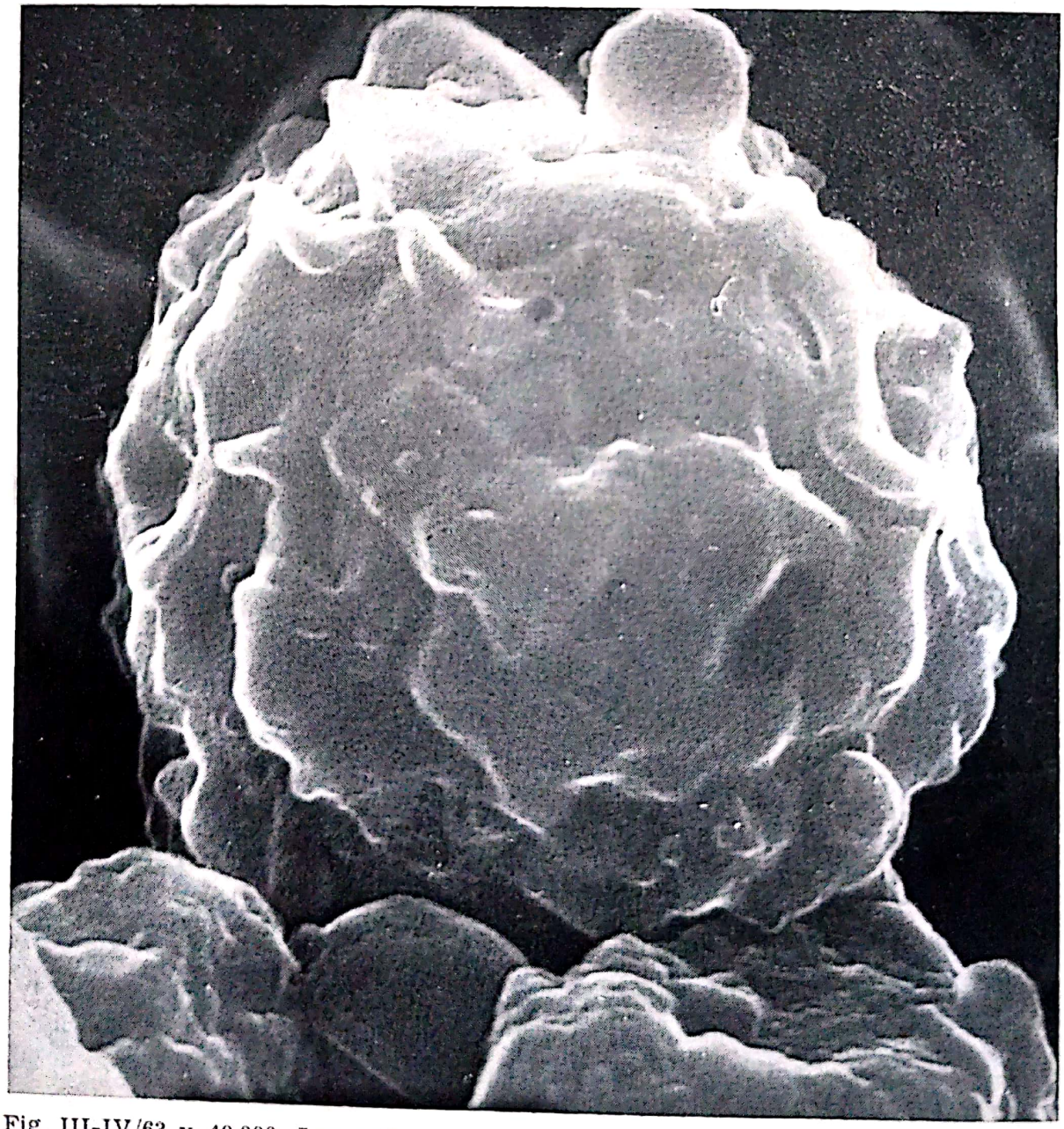


Fig. III-IV/63 x 40 000. Leucocitoconcentrat om — Leucemie monoblastică. Aspectul unui monoblast leucemic.

Scanned with OKEN Scanner

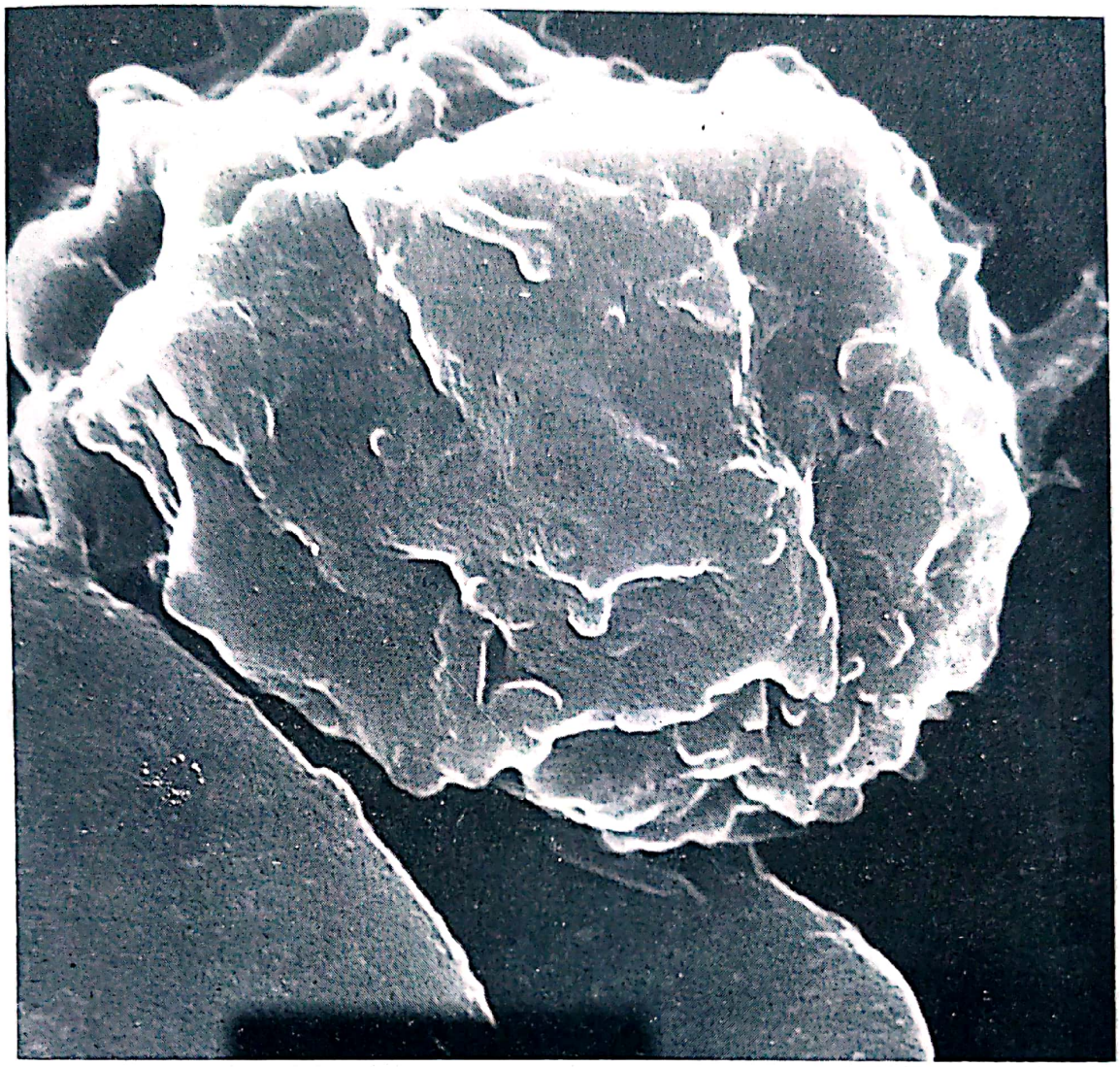


Fig. III-IV/64 x 36 000. Sînge periferic pasăre — Leucemie monocitară.

Scanned with OKEN Scanner

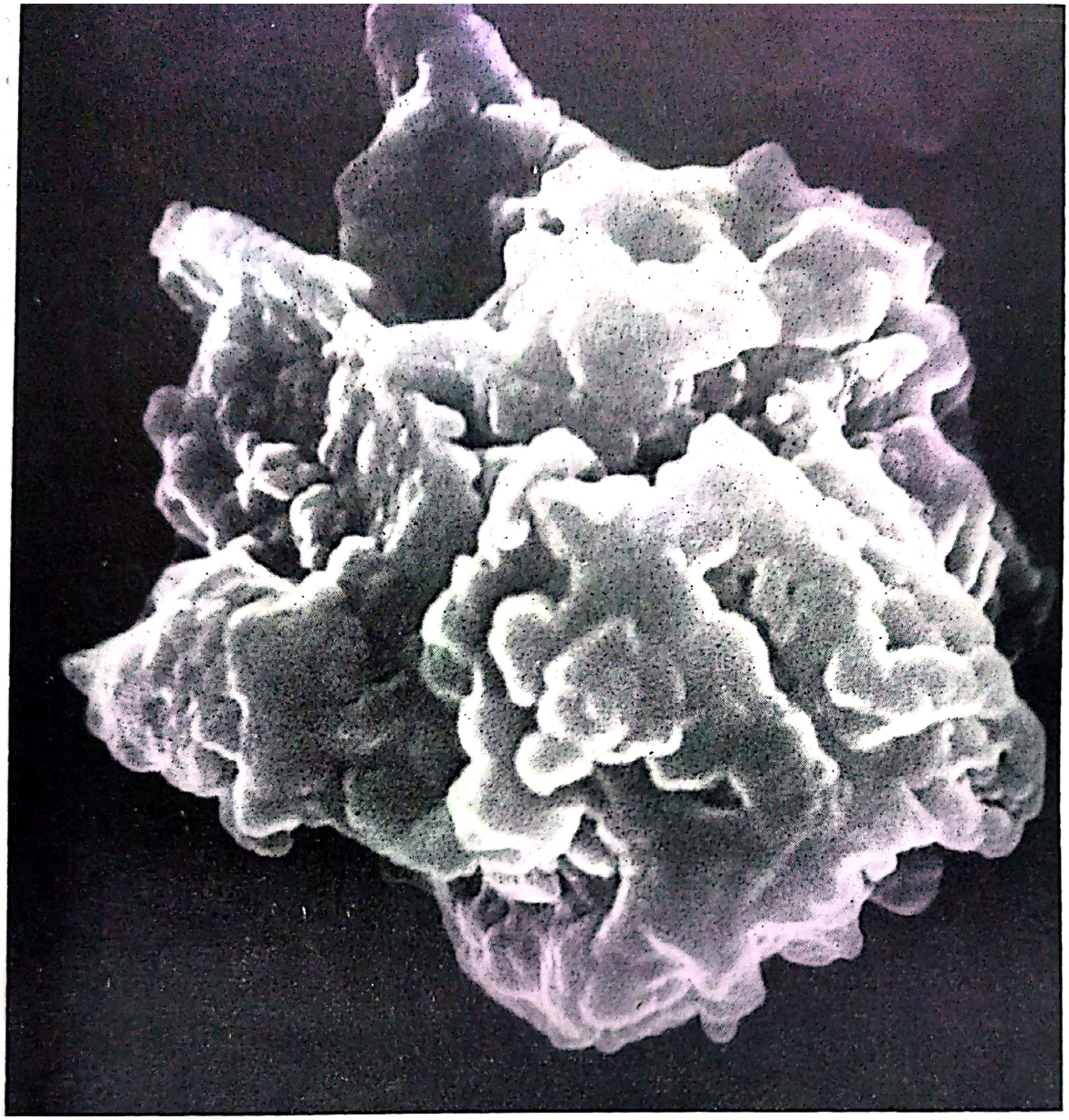


Fig. III-IV/65 x 45 000. Sînge periferic om — Leucemie monocitară. Monocit atipic.

Scanned with OKEN Scanner

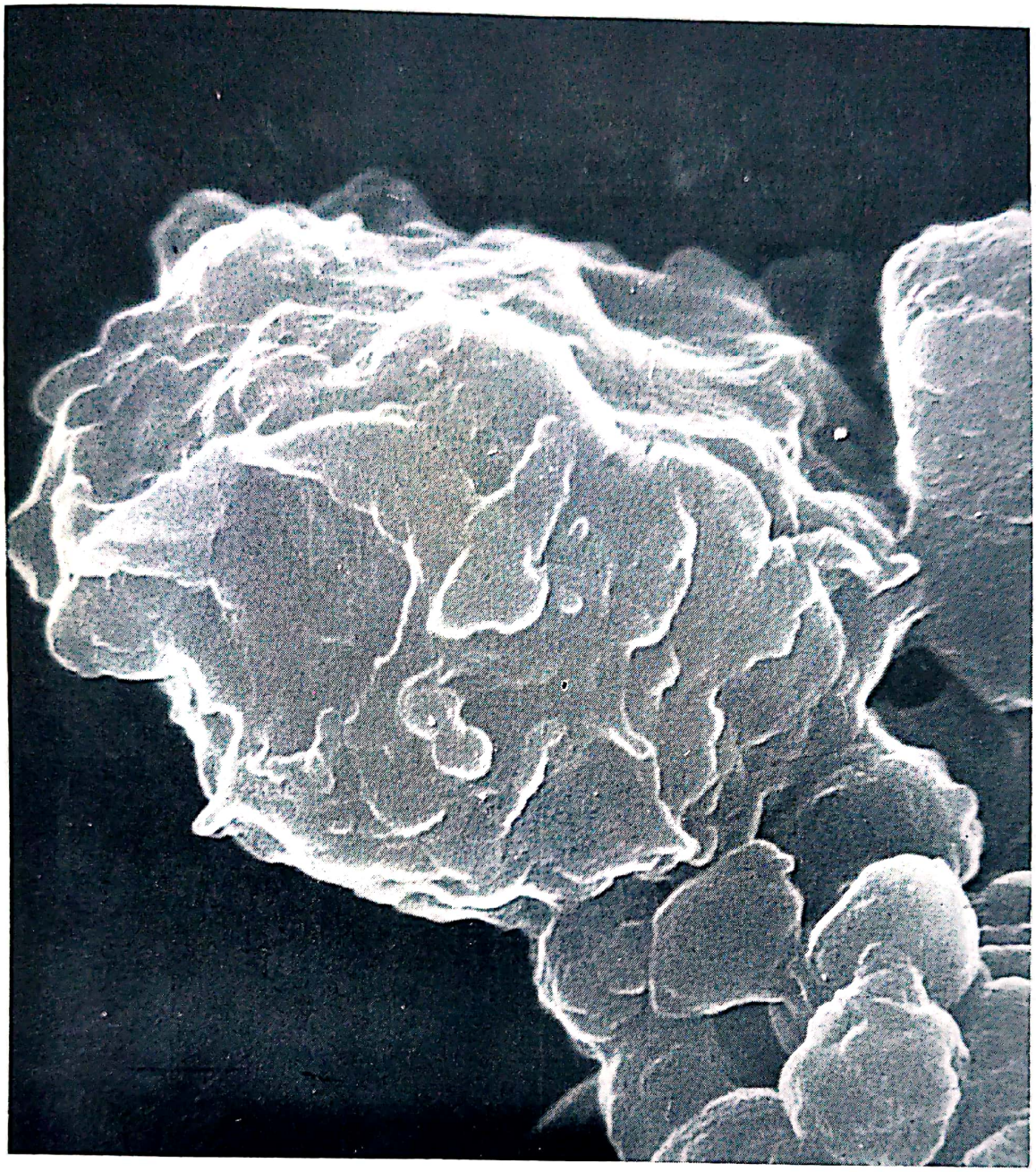


Fig. III-IV/66 × 27.000. Leucocitoconcentrat de om. Leucemie monocitară. Aspectul unui monoblast leucemic.

Scanned with OKEN Scanner

zentate de celule cu talii diferite, iar polimorfismul celular prezintă un avansat grad anaplazic : la multe dintre acestea apar imagini ca în leucemia cu hiary-cells (fig. III—IV 67, 68, 69).

În final se pot concluziona următoarele despre examenul organelor hematopoetice în cadrul unor hemopatii în SEM :

1. Este necesar ca tehnica SEM să devină un examen de rutină în hematologie și oncologie, pe considerentele :

— completează datele de hematologie și morfologie ;

— creează facilități deosebite în alcătuirea CITOGRAMELOR ;

— este o tehnică ieftină, simplă și comodă, în măsura în care aceste considerente importă la rezolvarea unor probleme importante în știință.

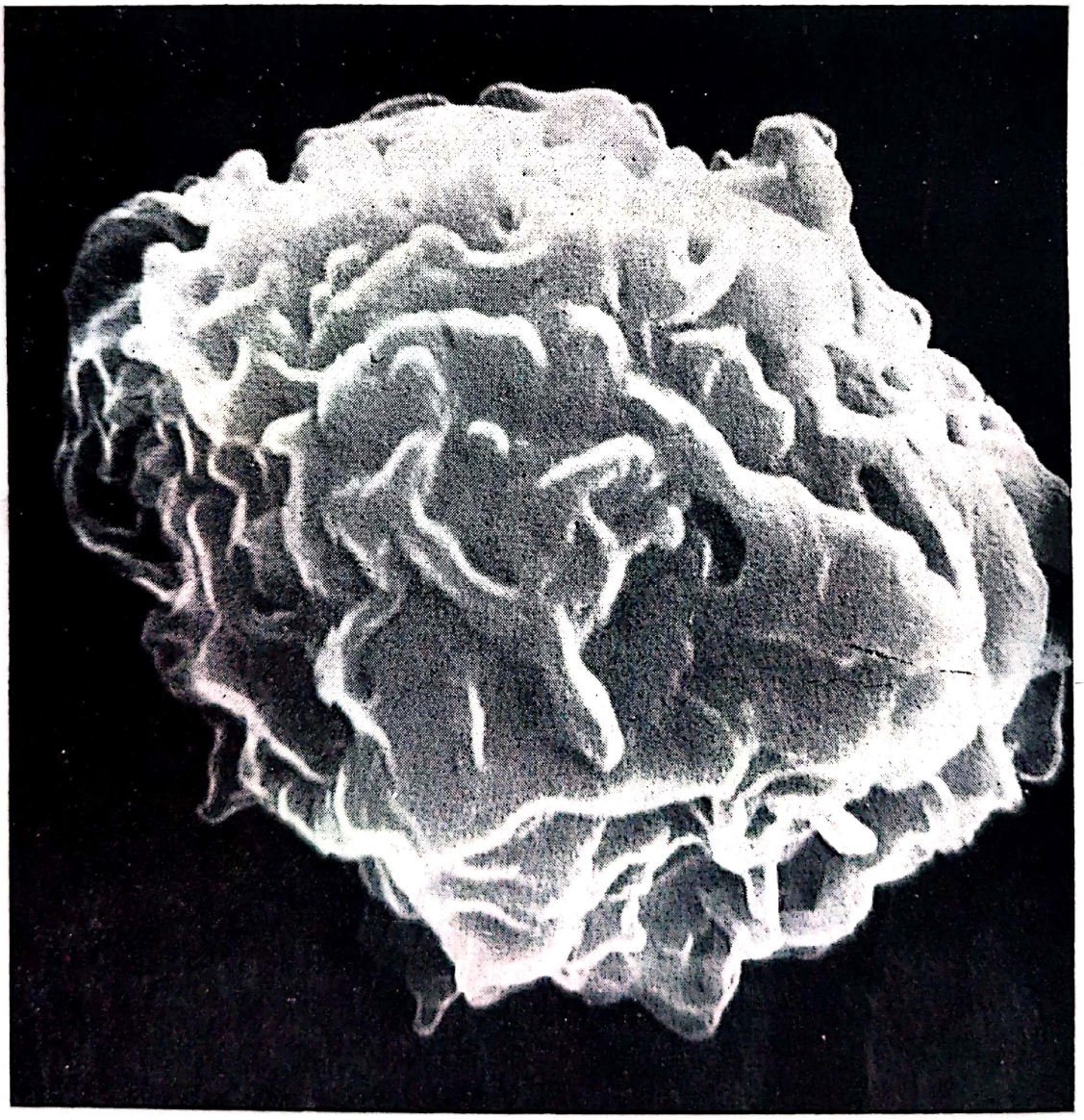


Fig. III-IV/67 x 40 000. Sînge periferic om — Leucemie histio-monocitară.

Scanned with OKEN Scanner

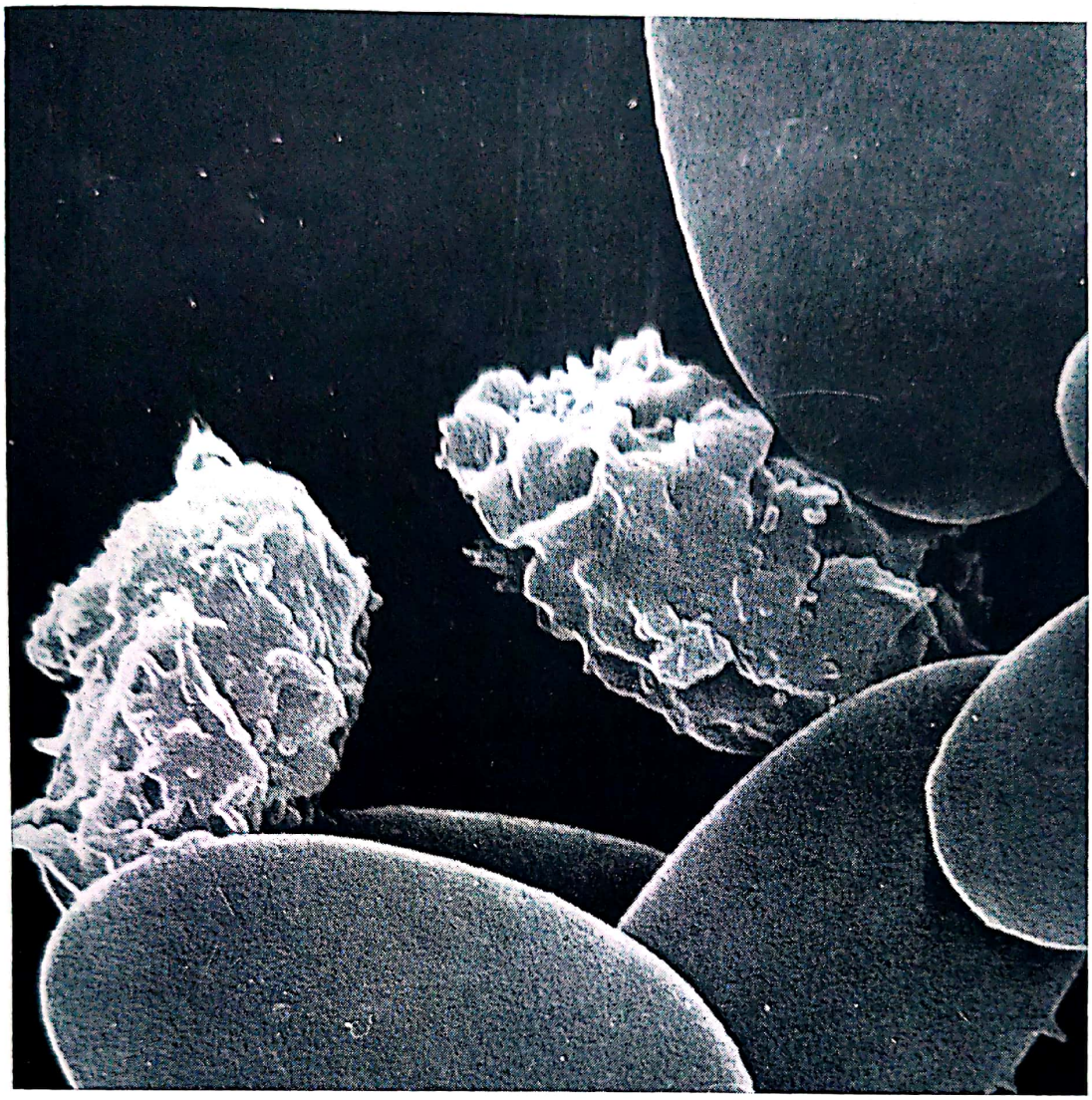


Fig. III-IV/68 x 18 000. Sînge periferic pasăre. Leucemie histio-monocitară.

Scanned with OKEN Scanner

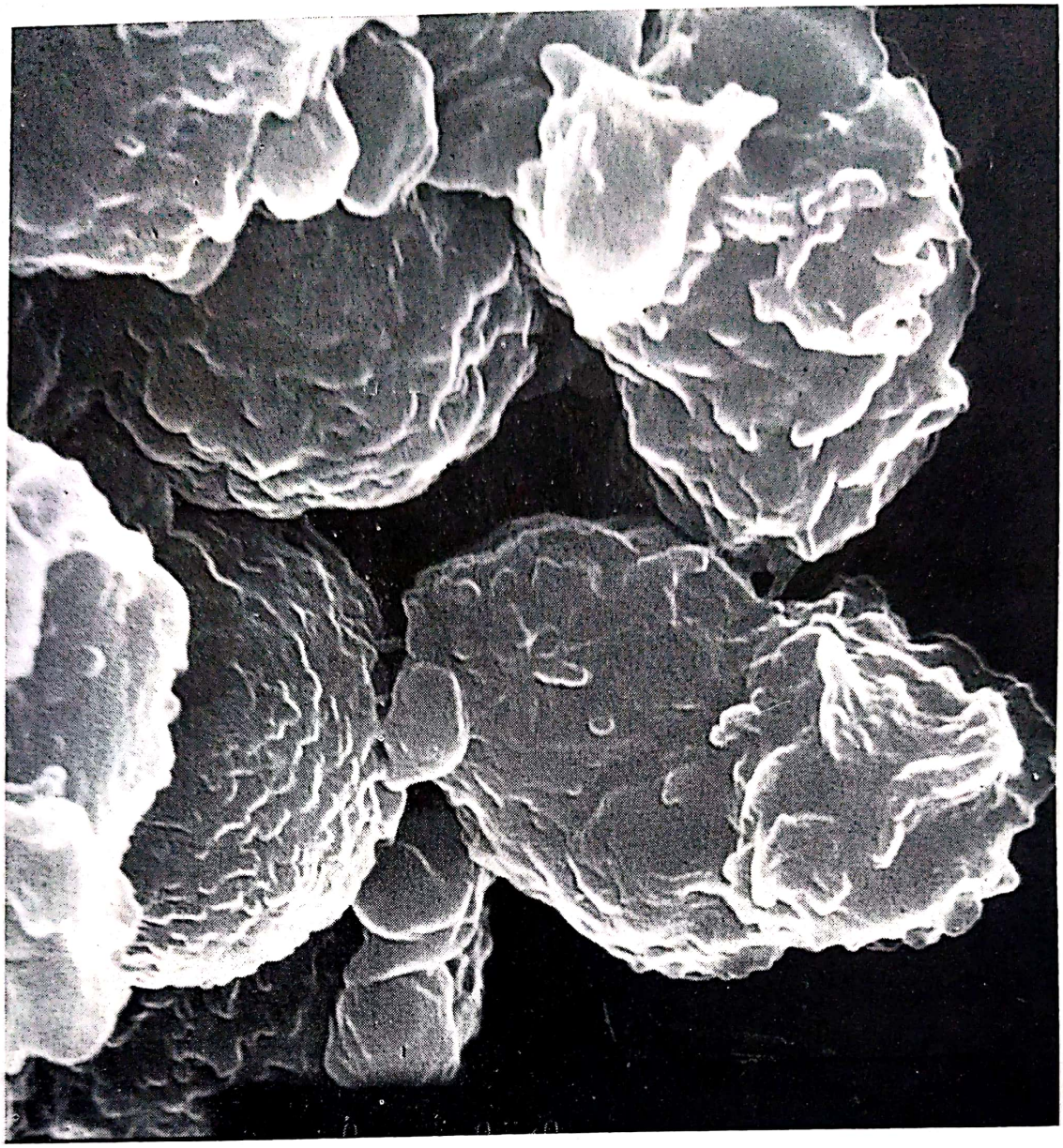


Fig. III-IV/69 × 15 000. Leucocitoconcentrat de vacă. Leucemie histio-monocitară. Grup de histio-monocite atipice.

Scanned with OKEN Scanner

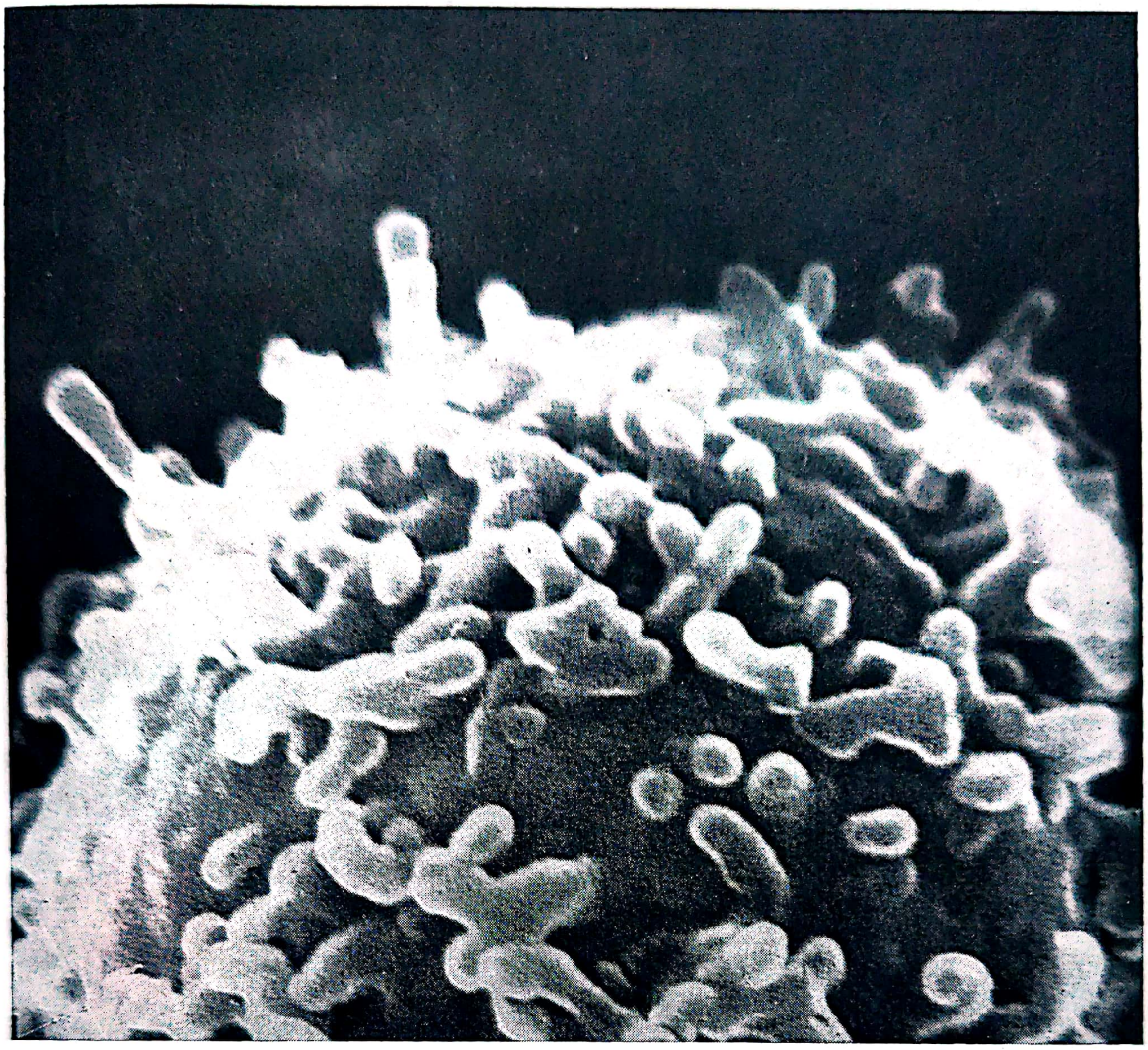


Fig. III-IV/70 x 72 000. Cultură de 72 h de limfocite porc stimulate cu polivinil-pirolidonul în caz de limfom malign. Se observă bine începutul hiperplaziei anaplazice a microvililor limfocitului „B".

Scanned with OKEN Scanner

Fig. III-IV/71 x 75 000. Cultură de 120 h de limfocite porc stimulate cu polivinil-pirolidonul în caz de limfom malign. Se vede clar manşonizarea microvililor puternic hiperplaziaţi anaplazic.

Scanned with OKEN Scanner

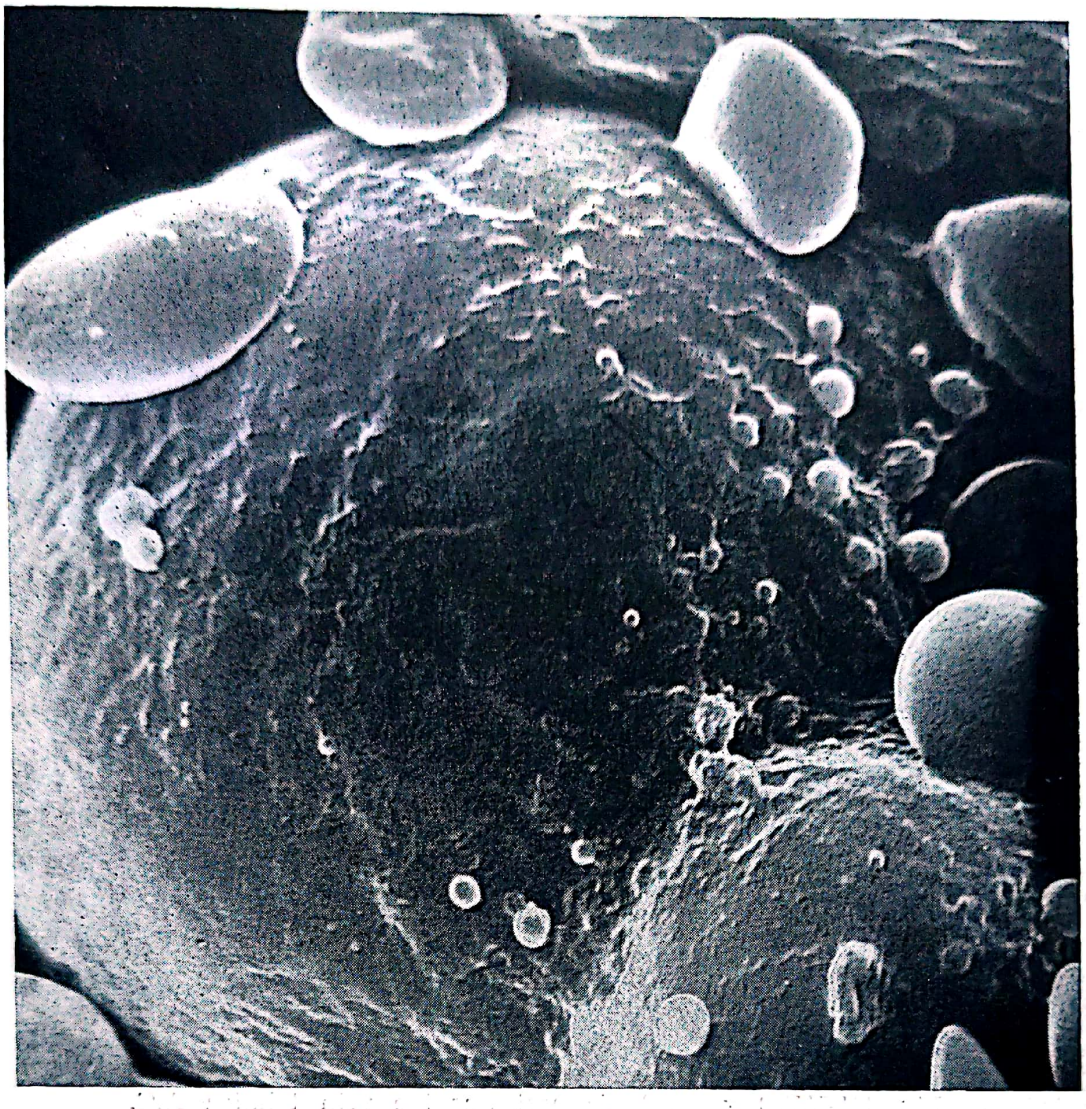


Fig. III-IV/72 x 3 000. Medulogramă pasăre normală — Megacariocit trombocitogen.

Scanned with OKEN Scanner

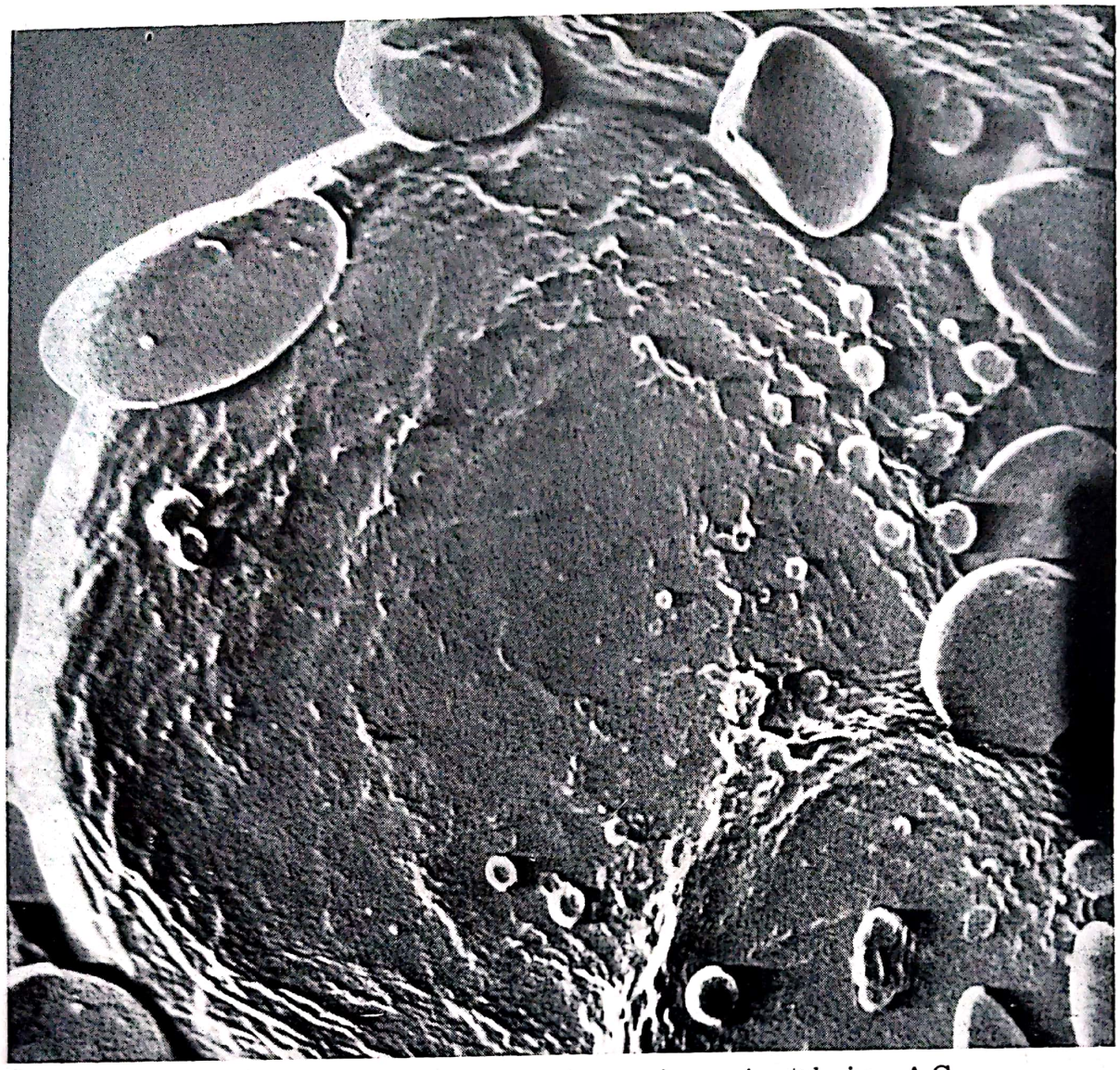


Fig. III-IV/73 x 3 000. Aceeași imagine prin tehnica A.C.

2. Cu ajutorul tehnicii SEM se pot aprecia formele de leucemie sau *sarcoame citemice* care au ca substrat celular celulele limfopoetice sau monocitopoetice.

3. Cu ajutorul tehnicii SEM, alături de testele imunologice de rozetare, se disting formele de LLC și LLA cu celule de tip „T" față de cele cu celule de tip „B".

BIBLIOGRAFIA capit. III și IV.

1. Baur P. S., Thurman G. B., Golstein A. L. : *Roappraisal of limphocyte classification by means of surface morphology,* J. Immunol. 115, 1375/(1975).
2. Bessis M., De Boisfleury A. : *Les mouvements des leukocytés étudiés an microscope electronique à balayage,* Nouv. Rev. Franc. Hemat. 11, 377, 1971.
3. Catovsky D., Pettit J. E., Galeto J., Okos A., Galton D. A : *The B-lymphocyte nature of the hiary cell of leukcemic reticuloendotheliosis,* Brit. J. Haemat. 26, 29, 1974.

Scanned with OKEN Scanner

4. Catovsky D., Frisch B., Van Noorden : *B.T. and „NULL" cell leukaemias Electron cytochemistry and surface morphology, Blood cells* 1, 115, 1975.
5. Coaen A. L., Marlow D. P., Garner G. E. : *A Rapid critical point method using fluorocarbons („FREONS") and intermediate and transitional fluids,* J. Microscop. 7, 331, 1968.
6. Cohnen G., Fischer K., Ludwig H., Brittingen G. : *„Surface morphology of normal and chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes,* Europ. J. Cancer, 12, 199, 1976.
7. De Harven, Lampen, N., Polliack A., Warfel A., Fogh J. : *New observations an methods for preparing cell suspensions for scanning electron microscopy,* Proc. 8 th. Annual SEM Symposium Chicago III, I.T.T. Research Inst. April, 1975, 361—367.
8. Golomb H. M., Braylan R., Reese C., Variakojis D., Brynes R., Yachain S. : The Sezary syndrome cell : *Surface ultrastructural characteristics,* Acta haemat. 54, 106, 1975.
9. Golomb H. M., Draylan A., Polliack A. : *„Hiary" celle leukaemia. A. Scanning electron microscop study of eight caser,* Brit. J. Haemat. 29, 455, 1975.
10. Golomb H. M., Reese C. : *Surface ultrastructural and marker characteristics of leukemic cells.* Proc 9th Annual SEM Symposium johari O(ED) Chicago III-I.T.T. Research Inst. 1976, 41—48.
11. Lin P. S., Cooper A. G., Wortis H. H. : *Scanning electron microscopy of human T cell and B cell rosettes,* New. Engl. J. Med. 289—548, 1973.
12. Manolescu N., Ciocnitu V., Păunescu Gh., Avram N. : *Tehnica baleiajului (Scaningului) mijloc de diferențiere a celulelor leucemice la animale,* Lucr. Anuar. I.C.V.B. „Pasteur", vol. 14, 1978.
13. Manolescu N., Ciocnitu V. : *Morfostructura exterioară a celulelor normale mononucleare sangvine la bovine, porcine și cabaline,* Lucr. Anuar. I.C.V.B. „Pasteur", vol. 14, 1978.
14. Manolescu N., Birza H., Caprarin A., Sinchievici B. : *Ghid de hematologie a animalelor crescute intensiv,* Buc., 1978, Edit. Ceres.
15. Păunescu Gh., Manolescu N., Avram N., Ciocnitu V., Grădinaru D. : *Testul de rozetare EAC și semnificația lui pentru studiul sistemului celular imun în leucoza bovină,* Lucr. Anuar. I.C.V.B. „Pasteur", vol. 14, 1978.
16. Polliack A. : *Surface morphology of leukemic cells,* Israel J. Med. Sci. 11, 1977 (701).
17. Polliack A. : *Normal Transformed and leukemic Leukocytes.* A. Scanning electron microscopy Axlan. 1977, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
18. Polliack A., Fu S. M., Donglas S. D., Bentwich Z., Lampen N., De Harven E. : *Scanning electron microscopy of human lymphocyte-Sheep erythrocyte rosettes,* J. Exp. Med. 140—146, 1974 b.
19. Polliack A., Lampen N., De Harven E : *Scanning electron microscopy of lymphocytes of Known B and T derivation,* Proc. 7th Annual Scanning Electron Microscope Symposium Johari O. (ED) Chicago III-I.T.T. Reseanch Inst. 1974 a pg. 673—682.
20. Polliack A., Lampen N., Clareson B. D., De Harven E., Bentwich Z., Siegal F. P., Kunkel H. G. : *Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy,* J. exp. Med. 138—607, 1973 (h).
21. Newel D. G., Roaths, Smith (J. L.) : *The scanning electron microscopy of normal peripheral blood lymphocytes,* Brit J. Haemat. 32, 309, 1976.
22. Padnos M. : *Differentiation of B and T mouse lymphocytes in cell suspension and smers,* Nature (Lond.) 259, 5540, 218 (1976).

Scanned with OKEN Scanner

Variaţia procentului (%) de celule limfo-monocitare în (SEM) la om şi animale în sîngele periferic normal

Nr. crt.	Denumirea celulei	Om	Bovine	Porcine	Ovine	Cabaline	Păsări
1.	Limfoblaşti „B“	0,02	0,05	0,07	0,06	0,04	0,09
2.	Prolimfocite „B“	0,7	1,0	0,9	1,3	1,5	1,0
3.	Limfocite „B“	9,0	8,5	8,0	7,5	10,0	12,5
4.	Limfoblaşti „T“	0,5	1,0	0,8	1,3	0,6	1,5
5.	Prolimfocite „T“	2,0	5,0	2,5	6,0	2,0	8,0
6.	Limfocite „T“	83,57	80,0	83,0	77,5	82,22	75,39
7.	Monoblaşti	0,01	0,05	0,03	0,07	0,04	0,02
8.	Histiocite	1,2	2,0	1,0	1,27	1,1	0,5
9.	Monocite	3,0	2,4	3,72	5,0	2,5	1,0

Schema de diagnostic în limfoame maligne

Examen clinic

Recoltări

Sînge periferic

Leucocitoconcentrat

Măduva hematopoetică (punctat)

Punctat. splenic

Punctat limfoganglionar

Examinarea fie pe rînd în timp a acestora, sau deodată, sau variante în funcţie de caz.

Obiect de investigat

Speciale

Det. hematologice optice MCG + coloraţii selective pentru nucleoli

Citochimie :
— lipide
— glicogen

Citoenzimologie :
— Peroxidaze
— Fosfatază alcalină
— Esteraze nesp.

Teste imunologice :
— Rozete
— I.D.
— I.F.

Ex. Baleiaj (SEM)

Idiograma

Virusologic
Electronoptic V. ARN tip „C“

Scanned with OKEN Scanner

Tabel III

Date de diagnostic diferențial între unele limfoame maligne și limforeticuloze

Nr. crt.	Felul investigației	L.L.C. „B“	L.L.C. „T“	L.L.A. „B“	L.L.A. „T“	L.P.L.	L.M.	L.H.M.
1.	Microscopie optică + + M.G.G. + colorații selective pentru nucleoli.	Identifică celule leucemice limfoide cronice fără diferențiere B.T.		Identifică celule leucemice limfoblastice acute fără diferențiere B.T.		Identifică celule leucemice paralimfobl.	Identifică celule leucemice tip monocitar.	Identifică celule leucemice histio-monocit.
2.	Citoenzimologie :	×	×	×	×	×	×	×
	— peroxidază	—	—	—	—	—	—	—
	— fosfatază alcalină	—	—	—	—	—	—	—
	— esterază nesp.	—	—	—	—	—	+++	++
3.	Citochimie :	×	×	×	×	×	×	×
	— glicogen	+++	+++	++,+	+++	+++	—	±
	— lipide	—	—	—	—	—	—	±
4.	Teste imunolog.							
	— imunodifuzie	++	++	++	++	—	++	++
	— rozete E.A.C.	++	—	++	—	—	—	—
	— rozete E.	—	++	—	++	—	—	—
	— imunofluorescența	++	++	++	++	++	++	++
5.	— Microscopia elec. Baleiaj (SEM)	identif. cel. „B“ leucemice limfoide	identif. cel. „T“ leuc. limf.	identif. cel. blas. „B“ limf.	identif. cel. „T“ blast. limfoide	identif. cel. paralimf.	identif. cel. monocitare	identif. cel. histio-monocitare

Scanned with OKEN Scanner

continuare Tabel III

Nr.	Felul investigaţiei	Limfopatii reactive	Histio-monocitoze reactive
1.	Microscopie optică M.G.G.+ colorații selective pentru nucleoli	Frecvent greu de diferențiat cu limfoame maligne în special stări de graniță	Mai ușor de diagnosticat datorită în special medulogramei ce este negativă în reacții și + în prolif.
2.	Citoenzimologie : — peroxidază	—	—
	— fosfatază alcalină	—	—
	— esterază nespecifică	—	++
3.	Citochimie · — Glicogen	++	±
	— Lipide	—	±
4.	Teste imunologice : — imunodifuzie	—	—
	— rozete E.A.C.	++	—
	— rozete E	++	—
	— imunofluorescența	—	—
5.	Microscopie electronică Baleiaj (SEM)	Evidențiază limfocite „T“ tipice și foarte rar blaste în mare procent	Evidențiază histio-monocite

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

SUMMARY

The purpose of this work is a presentation of the opportunities afforded by the scanning electron microscope (SEM) in the investigation of the lymphoplasmocytic and monocyto-histiocytic cell lines. These two cell lines have by now been best revealed by the markers of surface cytoarchitecture.

During a period of 3 years we were able to investigate with SEM a number of 280 cases of hemopathies both in principal domestic animals and in man, and we try to present our experience with this method as briefly as possible with an aim to be useful both to those who are familiar with it and to those wishing to know it and get into this field.

The work is divided into 4 distinctive chapters :

Chapter I — has an exclusively technical character offering minimum knowledge for rational and efficient use of the SEM by anyone having a sufficient degree of technical and scientific training.

The principles and construction of the equipment for SEM were treated in a more general manner, while the practical problems involved in obtaining quality images were presented in some cases in their smallest details, so that the prospective operator can be spared the loss of time caused by confusion in the assessment of the nature of some image defficiencies on the screen of.

In *Chapter II* the methods for obtaining preparations from specific hemopoietic organs for making them evident by SEM are described. The general principles concerning the technique for obtaining preparations, with details for every operation making up this complex technique are presented. The ways to collect biological preparations, to obtain them from whole blood, and from leukocytoconcentrate, hematopoietic bone marrow, limph nodes and spleen, bursa of Fabricius and peritoneal fluid are described. Then, the technique proper for the treatment of cells and tissues is presented : fixation, postfixation, dehydration, mounting on the holder, drying, and finally metallization. The techniques of special examination by SEM, as well as the techniques for preparation, as recommended by our experience, are also described.

This chapter is written in a critical vein, in the context of numerous „recepes" which, naturally, were experimented in most cases in man and only a few in mice, but without a sufficient profound technical study in animal species.

All this leads us to believe that there is a variability of techniques, depending on the investigated species, tissue (organ) or cell, for the preservation of the compared cytoarchitecture of the cell surface.

Chapter III presents cell types in the case of a normal hemopoiesis by SEM, describing the elements which form the limphocytogram both as to the cell size and shape and to the surface morphostructure. The existence of clear differences between the thymusdependent "T" lymphocytic line and medullo-dependent "B" is shown. The possibilities of differentiation between the adult (mature) cells within each cell line are also reviewed.

Finally, the histiomonocytic line with its characteristics (ruffles of the cell membrane being a genuine marker) is presented. The establishment of frequence variability of such cell lines in percentage for each species is also to be noted.

Chapter IV is dealing with the aspects of blood pathology in SEM. At first the malign limphomas are generally presented, then the particular aspects encountered in various cell forms of leukemias (C.L.L., A.L.L., P.L.L., M.L., H.M.L.) are described for each species (man, cattle, swine, horse, sheep and poultry). Separate images with cell surface moryhostructure and with shape and size of the cytemic cells from cytemic sarcomas are also shown, with comparisons between the above-mentioned species.

In conclusion, this work tries to present and define more accurately the place of the SEM examination of hematopoietic cells in comparison with other techniques of examination (optic microscopy and transmission electron microscopy), demonstrating that SEM investigation is essential for the proper and additional diagnosis of some hemopathies, this being also a sufficiently manageable and economic method.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

РЕЗЮМЕ

Настоящая научная работа ставит перед собой задачу ознакомления с возможностями сканированной электронной микроскопии в цельях исследования лимфоплазмоцитарных и моногистоцитарных клеточных линий. До сих пор эти две клеточные линии были выявлены наиболее ясно при помощи маркеров внешней цитоархитектонии.

В нашем опыте в области сканированной электронной микроскопии мы исследовали в течении трех лет около 280 случаев гемопатий как в основном животноводческом хозяйстве так и у человека. Настоящий труд — это попытка вкратце представить используемый метод в форме полезной как сведующим лицам, так и тем, которые желают ознакомиться с ним и приступить к работе в этой области. Труд содержит четыре главы:

Глава I: имеет сугубо технический характер и позволяет всем тем. кто обладает достаточным уровнем технической и научной подготовки, получить минимальные сведения для рационального и эффективного использования сканированного микроскопа (СЭМ).

Принципы действия и конструкция аппаратуры для сканирования представлены обобщено, а практические вопросы, связанные с получением качественных отображений, представлены весьма подробно с тем, чтобы помочь избежать потерю времени в случае неисправности или неясности отображений, появляющихся на экране катодной трубы и на карточке.

Глава II: описывает методы получения препаратов из специфических гематопоэтических органов в целях их сканированного выделения (СЭМ), а также общие принципы техники получения препаратов с подробностями каждого отдельного момента этого сложного процесса. Описаны способы взятия биологических препаратов, их получения из крови, лейкоконцентрата, гематообразующего мозга, лимфоузлов и селезенки, из фабрициевой бурсы и перитонеальной жидкости. Дальше представлена техника обработки клеток и ткани: фиксация, послефиксация, обезвоживание, монтаж на микроскопной подставке, высушивание и на конец металлизация. Описаны рекомендованные нашим опытом, техника специального сканированного исследования и техника получения препаратов.

Все исследования представленные в этой главе содержат критический подход к многочисленным „рецептам", экспериментация которых проводилась чаще всего на человеке и в меньшей мере на мышах без подробного технического описания результатов касательно других видов животных. Всё это позволило нам считать, что техники исследования варьируют в зависимости от вида животных, ткани (органа) или клетки, с целю предохранения цитоархитектонии клеточной внешности.

Глава III: представляет клеточную типизацию в случае сканированной гематопоэзы в нормальном состоянии, и описание елементов, составляющих лимфоцитограмму, как с точки зрения клеточной величины и формы, так и поверхностной структуры. Выявляется существование явных различий между тимодепендентной лимфоцитарной линией (Т) и медулодепендентной линией (В). Представлены возможности дифференцирования бластических элементов от взрослых элементов в рамках каждой клеточной линии.

В заключительной части представлена гистомоноцитарная линия со своими характеристиками (матии клеточной мембраны считаются настоящими маркерами). Отмечается также вариация частоты этих клеточных линий в процентах для каждого вида животных.

Глава IV: представляет аспекты сканированной кровяной патологии. В начале представлены злокачественные лимфомы вообще, а после этого они описаны отдельно для каждого вида (человек , крупный рогатый скот, свиньи, кони, овцы и птицы); и специфические аспекты, выявленные в различных формах клеток лейкемии (ХЛЛ, ОЛЛ, ПЛЛ, МЛ, ГМЛ). Также, представлены отдельно морфоструктуральные отображения внешнего вида клеток, форма и величина цитемических клеток системных сарком; их представление проводилось сравнительно между вышеуказанными видами животных.

В заключение научная работа пытается представить и установить место сканированного исследования гемматопоэзных клеток по сравнению с другими способами исследования (оптическим и электронноптическим в трансмиссии) и доказать, что метод сканированного исследования (СЭМ) необходим для точного и дополнительного диагноза некоторых гематий, имея в виду, что этот метод является достаточно доступным и экономичным.

Scanned with OKEN Scanner

CONTENTS

PREFACE 9
FOREWORD 11

CHAPTER I

SCANNING ELECTRON MICROSCOPE (SEM) TECHNIQUE (C. Dimitriu)

1. Principles of the scanning electron microscope (SEM) use 13
1.1. Types of signals 14
1.2. Reconstitution of the images 15
1.3. Contrast 16
1.4. Resolution 22
1.5. Murmur 23

2. Equipment for SEM 24
2.1. Scanning electron microscope (SEM) 24
2.2. Equipment for metallization 27

3. Requirements for obtaining high quality SEM images . . . 30
3.1. Focusing 31
3.2. Astigmatism 31
3.3. Cleaning of the column and aperture 31
3.4. Liquid nitrogen 33
3.5. Aperture diameter 33
3.6. Tension of acceleration 33
3.7. Metallization 37
3.8. Photographing 37

CHAPTER II

METHODS FOR OBTAINING PREPARATIONS FROM SPECIFIC HEMATOPOIETIC ORGANS FOR MAKING THEM EVIDENT WITH SEM (V. Ciocnitu) 39

4. General principles concerning the technique for obtaining preparations for examination with SEM 39
4.1. Way of collection of the biological preparations 40
4.1.1. Preparations from the whole blood 40

Scanned with OKEN Scanner

4.1.2. Preparations from leukoconcentrate 41
4.1.3. Preparations from hematopoietic bone marrow 41
4.1.4. Preparations from limph nodes 42
4.1.5. Preparations from spleen 42
4.1.6. Preparations from bursa of Fabricius 42
4.1.7. Preparations from peritoneal fluid 43
4.2. Techniques of preparation of the collected cells 43
4.2.1. Fixation 44
4.2.2. Postfixation 46
4.2.3. Dehydration 47
4.2.4. Mounting on the holder 48
4.2.5. Drying 48
4.2.6. Metallization 49
4.3. Special examinations 49

5. Recomanded techniques of preparation 52

CHAPTER III

TYPING OF THE NORMAL HEMATOPOIETIC CELLS WITH SEM (N. Manolescu — V. Ciocnitu) 59

6. Comparative description of the normal cells which can be differentiated with SEM 59

6.1. Lymphoid line 60
6.1.1. "T" lymphocytes 60
6.1.1.1. "T" lymphoblasts 60
6.1.1.2. "T" prolymphoblasts 61
6.1.1.3. "T"mature lymphocytes 62
6.1.2. "B" lymphocytes 62
6.1.2.1. "B" lymphoblasts 63
6.1.2.2. "B" prolymphoblasts 64
6.1.2.3. "B" mature lymphocytes 68
6.2. Histiocytic line 77
6.2.1. Monoblast and histioblast 77
6.2.2. Histiocyte 78
6.2.3. Monocyte 79
6.2.4. Macrophagic histiocyte 79

CHAPTER IV

BLOOD PATHOLOGY ASPECTS WITH SEM (N. Manolescu) . 81

7. Malign lymphomas in general 81

7.1. Aspects of sarcomatous transformation of the lymphocyto-proliferative elements (cells) 83
7.1.1. Shape and size of sarcomatous cell 83
7.2. Chronic lymphoid leukemia (CLL) 98

Scanned with OKEN Scanner

7.3. Acute lymphoid leukemia (ALL) 104
7.4. Paralymphoblastic leukemia (PLL) 116
7.5. Monocytic leukemia (ML) 124
7.6. Histiomonocytic leukemia (HML) 126
Bibliography 136
Summary 141

Scanned with OKEN Scanner

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие 9
Введение 11

ГЛАВА I.

ТЕХНИКА СКАНИРОВАННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ (СЭМ). Ц. Димитриу 13

I. **Принципы сканированного электронного микроскопа (СЭМ)** 13

1.1. Типы сигналов 14
1.2. Восстановление изображения образца 15
1.3. Контраст 16
1.4. Резолюция 22
1.5. Шум 23

2. **Аппаратура сканирования (СЭМ)** 24

2.1. Электронный микроскоп для сканирования 24
2.2. Аппаратура для металлизации 28

3. **Непременные условия получения качественных изображений** . . . 30

3.1. Фокусирование 31
3.2. Астигматизм 31
3.3. Очистка колонки и аппаратуры 31
3.4. Азот жидкий 33
3.5. Диаметр аппаратуры 33
3.6. Напряжение ускорения 33
3.7. Электронный контраст 37
3.8. Фотографирование 37

ГЛАВА II

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ИЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕМА ТОПОЭТИЧЕСКИХ ОРГАНАХ, С ЦЕЛЬЮ ИХ СКАНИРОВАННОГО ВЫДЕЛЕНИЯ (СЭМ) В. Чокниту 39

4. **Общие принципы техники сканированного выделения препаратов (СЭМ)** 39

4.1. Начин взятия проб биологических препаратов 40
4.1.1. Препараты из цельной крови 40
4.1.2. Препараты из лейкоконцентрата 41

Scanned with OKEN Scanner

4.1.3. Препараты из красного мозга 41
4.1.4. Препараты из лимфоузлов 42
4.1.5. Препараты из селезенки 42
4.1.6. Препараты из фабрициевой бурсы 42
4.1.7. Препараты из перитонеальной жидкости 43
4.2. Техника приготовления взятых клеток 43
4.2.1. Фиксация 44
4.2.2. Послефиксация 46
4.2.2.1. Послефиксация в тетраокись осмия 46
4.2.2.2. Послефиксация в перманганате калия 47
4.2.2.3. Послефиксация в хроме-осмий 47
4.2.3. Обезвоживание 47
4.2.4. Высушивание 48
4.2.5. Монтаж на подставке микроскопа (хольдер) 48
4.2.6. Металлизация 49
4.3. Специальные исследования 49

5. Рекомандование других техник 52

ГЛАВА III.
СКАНИРОВАННАЯ ТИПИЗАЦИЯ НОРМАЛЬНЫХ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК (СЭМ) Н. Манолеску, В. Чокниту 59

6. Сравнительное описание нормальных клеточных линий, которые возможно дифференцировать путём сканирования (СЭМ) 59

6.1. Лимфоидная линия 60
6.1.1. Лимфоцитарные клетки Т 60
6.1.1.1. Лимфобласты Т 60
6.1.1.2. Пролимфобласты Т 61
6.1.1.3. Взрослые лимфоциты 62
6.1.2. Лимфоцитарные клетки В 62
6.1.2.1. Лимфобласты В 63
6.1.2.1. Пролимфобласты В 64
6.1.2.3. Взрослые лимфоциты В 68
6.2. Гистомоноцитарная линия 77
6.2.1. Монобласт и гистобласт 77
6.2.2. Гистоцит 78
6.2.3. Моноцит 79
6.2.4. Монографический гистоцит 79

ГЛАВА IV
ВИДЫ СКАНИРОВАННОЙ КРОВЯНОЙ ПАТОЛОГИИ (СЭМ).
Н. Манолеску 81

7. Общие злокачественные лимфомы 81

7.1. Виды саркоматозного преобразования лимфомоноцито-пролиферативных элементов 83
7.1.1. Форма и размер саркоматозной клетки 83
7.1.2. Поверхностная морфоархитектоника 83

Scanned with OKEN Scanner

7.2. Хроническая лимфоидная лейкемия (ХЛЛ) 98
7.3. Острая лимфоидная лейкемия (ОЛЛ) 104
7.4. Паралимфобластическая лейкемия (ПЛЛ) 116
7.5. Моноцитарная лейкемия (МЛ) 124
7.6. Гистомоноцитарная лейкемия (ГМЛ) 126
Библиография 136
Содержание 141
Резюме 143

Scanned with OKEN Scanner

ERATĂ

La pag. 67 se va citi : Fig. III-IV/8×42 000 Leucocitoconcentrat la om normal. Limfocit „B“ — prezența în număr mare a microvililor (formațiuni digitiforme) fine și mai numeroase. Tehnica de examinare prin A.C.

La pag. 94 se va citi : Fig. III-IV/32 × 25 000 Sînge periferic de cal — Anemie infecțioasă acută. Celulă sarcomatoasă nediferențiată.

Scanned with OKEN Scanner

Redactor : Dr. GHEORGHE ȚANE
Tehnoredactor : MARILENA DAMASCHINOPOL
Coli de tipar : 9,50. Tirajul : 3 100 ex. Bun de tipar : 9.06.1979.

Tiparul executat sub comanda 191 la I. P. „Filaret", str. Fabrica de chibrituri nr. 9—11, București.
Republica Socialistă România

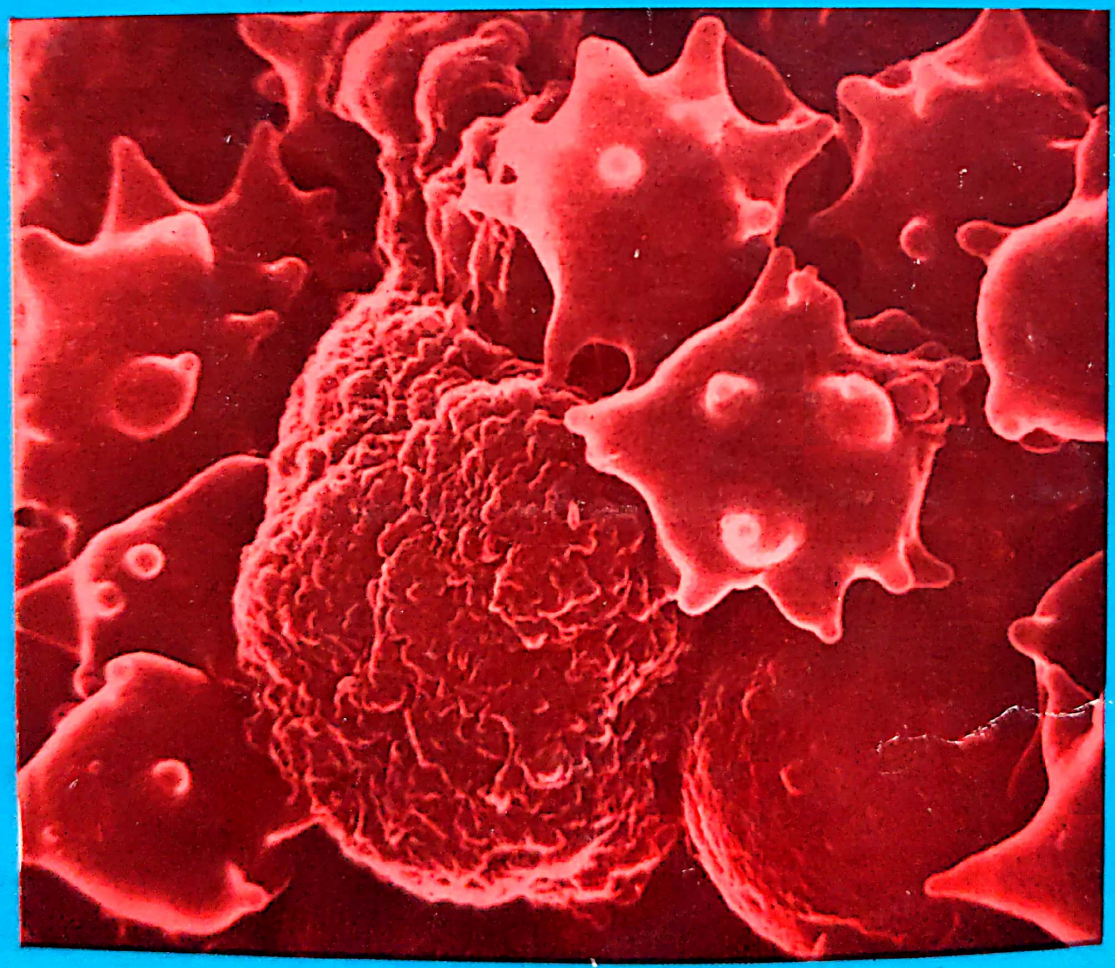
Scanned with OKEN Scanner

252

Lei 24

T1762

751177



Scanned with OKEN Scanner